

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROSANA ELISA GONÇALVES GONÇALVES PINHO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA DINAMINA DO *Trypanosoma cruzi*.

CURITIBA

2013

ROSANA ELISA GONÇALVES GONÇALVES PINHO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA DINAMINA DO *Trypanosoma cruzi*.

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Stenio P. Fragoso

CURITIBA

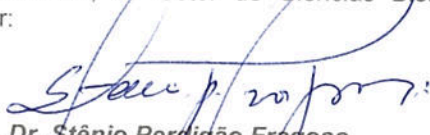
2013

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)


PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC


Profa. Dra. Iriane Eger
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG


Profa. Dra. Larissa Reifur
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Lía Carolina Almeida Soares de Medeiros
Instituto Carlos Chagas - ICC

E tendo como suplentes,

Prof. Dr. Maurílio José Soares
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir a candidata Rosana Elisa Gonçalves Gonçalves Pinho, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização funcional da dinamina do Trypanosoma cruzi" são de parecer favorável à aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Julho de 2013

Dedico este trabalho ao meu sempre primo João Paulo, que já cumpriu sua missão aqui no plano terrestre, ao meu filho João, que me mostrou o real sentido da vida e ao meu marido Marcio, pela parceria eterna.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho nunca se faz sozinho, na verdade a influência externa é muito maior do que podemos imaginar. Por isso tenho muito a agradecer pela realização deste trabalho. Talvez a citação de nomes seja injusto pela sua imensidão, mas aqui vão alguns agradecimentos que também seria injusto não fazer.

À Deus pela grande oportunidade de estar aqui sempre aprendendo e evoluindo.

Ao meu orientador Dr. Stenio Perdigão Fragoso pela orientação, compreensão e confiança.

Ao Dr. Maurílio Soares pela paciência e colaboração intensa neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular de Tripanossomatídeos do Instituto Carlos Chagas: Lígia, Camila, Lia, Luz, Bia e Cassiano.

Aos meus grandes e queridos companheiros de bancada do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos do Instituto Carlos Chagas: Flávia, Claudia, Daniela, Alda, Adriana, Fernando, Mônica, Gisele e Vanessa.

Ao Rafael Kessler pela ajuda com as análises no citômetro de fluxo.

À Mariana Serpeloni pela imensa ajuda durante todo este trabalho e pelas noites sem dormir fazendo as montagens das pranchas de microscopia.

À Maria Cristina e Vivielin pela disponibilidade a resolver nossos problemas.

Ao Nilson, Vanessa, Tânia, Sílvio e Cibeles pelo apoio técnico, facilitando a realização deste trabalho.

A todos os amigos e pesquisadores do Instituto Carlos Chagas por compartilharem comigo seus conhecimentos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa do seu coordenador Prof. Dr. Edvaldo Trindade, pelo apoio recebido.

À agência financiadora CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais Ana e Evilásio pelo apoio e amor incondicional. Serei eternamente grata a vocês por terem me recebido como filha e por se dedicarem a mim e, agora, ao meu filho João de uma maneira tão pura.

Ao meu amado irmão Rafael (ou Marcos) por tudo que vivemos juntos e pelo amor que nutrimos um pelo outro.

Ao meu marido Marcio pelo apoio, amor, dedicação, companheirismo e pelas batalhas que decidimos enfrentar juntos.

Aos amigos espirituais pelas orações, motivação, ideias e intuição.

E finalmente, ao meu filho João que me fez uma pessoa completa.

Todo efeito tem uma causa. Todo efeito inteligente tem uma causa inteligente. O poder da causa inteligente está na razão da grandeza do efeito.

Allan Kardec

RESUMO

O protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença humana transmitida por vetor e com alta prevalência na América Latina. Para sua eficiente sobrevivência, *T. cruzi* capta nutriente, por uma via dependente de receptor (endocitose), no ambiente em que se encontra hospedado. Sabe-se que as dinaminas clássicas tem um importante papel nesse processo. Outros membros da superfamília das dinaminas participam, além da endocitose, de vários outros eventos celulares tais como fissão e fusão de organelas, citocinese e também estão envolvidas na resistência a infecções virais em vertebrados. Nosso objetivo principal é caracterizar a função de TcDLP utilizando diversas abordagens em biologia celular e molecular. TcDLP compartilha características biofísicas com suas homólogas presente em outros organismos. A proteína se localiza principalmente nas regiões que ocorrem endocitose (bolsa flagelar e complexo citóstoma/citofaringe) e está expressa durante todo o ciclo de vida do parasita. Não foi possível obter o mutante *Tcdlp*-nulo, sugerindo que o gene codificador da proteína TcDLP é um gene essencial. A cepa simples nocaute expressa TcDLP em menor quantidade quando comparado com a cepa selvagem, mas essa diminuição na quantidade de proteína não causa uma aparente alteração celular. Utilizando mutações dominante negativo, foi observado alterações celulares tais como alterações morfológicas, alargamento da mitocôndria e do complexo de Golgi e alteração no ciclo celular.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Dinamina. Nocaute gênico. Efeito dominante negativo.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, a highly prevalent vector-borne human disease in Latin America. For efficient survival, *T. cruzi* is dependent on receptor-mediated uptake of nutrients (endocytosis) from the host environment. It has been well studied the role of classical dynamins in that process. Other dynamin superfamily members appear to participate in a large subset of intracellular reactions, such as endocytosis, organelles fusion and fission, cytokinesis and resistance to viral infections in vertebrate. Our main goal is to characterize the TcDLP function using several approaches in cell and molecular biology. TcDLP shares common biophysical characteristics with its homologs in other organisms. The protein localizes mostly in regions that occur endocytosis (flagellar pocket and cytostoma/cytopharynx complex) and is expressed during all life cycle forms of the parasite. It was not possible to obtain the Tcdlp-null mutant, suggesting that TcDLP encoding gene is essential. Deletion of a single allele of the tcDLP gene was not sufficient to cause cellular changes. By dominant-negative mutations was observed some cellular alterations such as morphological changes, mitochondria and Golgi apparatus enlargement, and abnormal cell cycle.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Dynamin. Gene knockout. Dominant-negative effect .

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	PAPEL DA DINAMINA NA ENDOCITOSE MEDIADA POR CLATRINA.....	1
FIGURA 2 –	ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA DINAMINA.....	4
FIGURA 3 –	ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA DINAMINA COM BASE EM SUA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL.....	6
FIGURA 4 –	INTERFACES DE DIMERIZAÇÃO E OLIGOMERIZAÇÃO.....	8
FIGURA 5 –	MODELO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA DINAMINA EM FORMA DE HÉLICES.....	9
FIGURA 6 –	ALINHAMENTO DE DOMÍNIOS GTPase MOSTRANDO OS QUATRO MOTIVOS CONSERVADOS.....	10
FIGURA 7 –	DIMERIZAÇÃO DO DOMÍNIO G.....	12
FIGURA 8 –	ARQUITETURA DOS DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS MEMBROS DA SUPERFAMÍLIA DAS DINAMINAS.....	14
FIGURA 9 –	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE MEMBROS DA SUPERFAMÍLIA DAS DINAMINAS.....	15
FIGURA 10 –	MODELO DE ATUAÇÃO DA DINAMINA NA FORMAÇÃO DE VESÍCULAS – “TORNQUETE”.....	17
FIGURA 11 –	MODELO DE ATUAÇÃO DA DINAMINA NA FORMAÇÃO DE VESÍCULAS – “MOLA”.....	17
FIGURA 12 –	MODELO DE CISÃO DE MEMBRANAS PELA DINAMINA BASEADO EM DADOS CRISTALOGRAFICOS.....	20
FIGURA 13 –	CICLO BIOLÓGICO DO <i>T. cruzi</i> NO INTERIOR DO INSETO VETOR E DO MAMÍFERO HOSPEDEIRO.....	24
FIGURA 14 –	ESQUEMA DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DE <i>T. cruzi</i>	27
FIGURA 15 –	VIAS DE ENDOCITOSE.....	29
FIGURA 16 –	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GENE <i>Tcdlp</i>	

	UTILIZANDO AS REGIÕES INTERGÊNICAS.....	40
FIGURA 17 –	ESQUEMA DOS VETORES DE CLONAGEM PARA NOCAUTE GÊNICO.....	42
FIGURA 18 –	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GENE <i>Tcdlp</i> UTILIZANDO AS REGIÕES CODIFICANTES.....	43
FIGURA 19 –	MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221.....	50
FIGURA 20 –	ESQUEMA DO VETOR pTcGW-ProtCcarboxi.....	52
FIGURA 21 –	ALINHAMENTO DAS PROTEÍNAS TcDLP E DINAMINA 1 HUMANA.....	73
FIGURA 22 –	ALINHAMENTO DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DAS PROTEÍNAS TcDLP E DINAMINA 1 HUMANA.....	74
FIGURA 23 –	ESQUEMA REPRESENTANDO A ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA TcDLP.....	74
FIGURA 24 –	ALINHAMENTO DE DOMÍNIOS GTPase MOSTRANDO OS QUATRO MOTIVOS CONSERVADOS.....	75
FIGURA 25 –	ALINHAMENTO DAS DLPs DOS ORGANISMOS <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcDLP), <i>Trypanosoma brucei</i> (TbDLP) e <i>Leishmania major</i> (LmDLP).....	76
FIGURA 26 –	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-TcDLP.....	77
FIGURA 27 –	WESTERN BLOT UTILIZANDO SORO ANTI-TcDLP E EXTRATO DE PROTEÍNAS DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	78
FIGURA 28 –	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TCDLP NO CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	79
FIGURA 29 –	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcDLP NAS FORMAS EPIMASTIGOTA E TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	80
FIGURA 30 –	PURIFICAÇÃO DA TcDLPMAGMH391AAAAA/ΔL4.....	82
FIGURA 31 –	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE	

	TcDLPMAGMH391AAAAA/ Δ L4 POR ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO.....	84
FIGURA 32 –	PURIFICAÇÃO DE <i>HIS</i> ₆ -TcDLP POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	85
FIGURA 33 –	ENSAIO DE COSEDIMENTAÇÃO DE LIPOSSOMOS.....	86
FIGURA 34 –	ESQUEMA REPRESENTANDO A LIGAÇÃO DA DINAMINA A UM LIPOSSOMO.....	87
FIGURA 35 –	ENSAIO DE TUBULUÇÃO DE LIPOSSOMOS.....	87
FIGURA 36 –	ANÉIS DE DINAMINA.....	88
FIGURA 37 –	AMPLIFICAÇÃO DOS CASSETE UTILIZADOS NA TRANSFEÇÃO DE <i>T. cruzi</i> PARA OBTENÇÃO DA CEPA NOCAUTE.....	89
FIGURA 38 –	ESQUEMA REPRESENTANDO A SEGUNDA ESTRATÉGIA UTILIZADA NO NOCAUTE GÊNICO DE TcDLP.....	90
FIGURA 39 –	ANÁLISE DO SIMPLES NOCAUTE GÊNICO POR <i>SOUTHERN BLOT</i>	91
FIGURA 40 –	EXPRESSÃO DE TcDLP NA CEPA SIMPLES NOCAUTE.....	92
FIGURA 41 –	COLORAÇÃO PELO MÉTODO PANÓTICO RÁPIDO DA CEPA SIMPLES NOCAUTE <i>T. cruzi</i> ^{dlp/Δdlp::neo}	93
FIGURA 42 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RESÍDUO DE LISINA MUTADO PARA A OBTENÇÃO DA PROTEÍNA MUTANTE TcDLPK39A.....	95
FIGURA 43 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DD.....	96
FIGURA 44 –	<i>WESTERN BLOT</i> REALIZADO PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA FUSÃO DD-TcDLPK39A.....	96
FIGURA 45 –	ALTERAÇÃO MITOCONDRIAL CAUSADO PELO EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO <i>Trypanosoma cruzi</i> , VISUALIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	98
FIGURA 46 –	ULTRAESTRUTURA DA FORMA EPIMASTIGOTAS DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	99

FIGURA 47 –	ALTERAÇÃO DO COMPLEXO DE GOLGI CAUSADO PELO EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO PARASITA <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	99
FIGURA 48 –	ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA DO PARASITA <i>Trypanosoma cruzi</i> CAUSADO PELO EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A VISUALIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	100
FIGURA 49 –	ALTERAÇÃO NA DIVISÃO CELULAR DO PARASITA <i>Trypanosoma cruzi</i> CAUSADO PELO EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A VISUALIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	101
FIGURA 50 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR MICROSCOPIA ÓPTICA – PAINEL 1.....	102
FIGURA 51 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR MICROSCOPIA ÓPTICA – PAINEL 2.....	103
FIGURA 52 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR MICROSCOPIA ÓPTICA – PAINEL 3.....	104
FIGURA 53 –	REPRESENTAÇÃO DOS CINCO RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS MUTADOS PARA A OBTENÇÃO DA PROTEÍNA MUTANTE TcDLPMAGMH391-395AAAAA.....	106
FIGURA 54 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS VETORES pNEO3xFlag E pNEO3xHA.....	108
FIGURA 55 –	ANÁLISE DAS EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>Trypanosoma cruzi</i> POR <i>WESTERN BLOT</i>	109
FIGURA 56 –	ANÁLISE DAS EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS	

	RECOMBINANTES EM <i>Trypanosoma cruzi</i> POR WESTERN BLOT.....	110
FIGURA 57 –	ENSAIO DE ENDOCITOSE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c...	113
FIGURA 58 –	ENSAIO DE ENDOCITOSE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO GFP-FLAG.....	114
FIGURA 59 –	ENSAIO DE ENDOCITOSE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO TcDLP-FLAG.....	114
FIGURA 60 –	ENSAIO DE ENDOCITOSE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO TcDLP-FLAG.....	115
FIGURA 61 –	ENSAIO DE ENDOCITOSE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO TcDLP-HA.....	116
FIGURA 62 –	ENSAIO DE ENDOCITOSE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA.....	117
FIGURA 63 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITAS CONTENDO APENAS UM CINETOPLASTO....	122
FIGURA 64 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA-FLAG NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO APENAS UM CINETOPLASTO.....	122
FIGURA 65 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO APENAS UM NÚCLEO.....	123
FIGURA 66 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE MUTANTES DE TcDLP NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO MATERIAL GENÉTICO REDUZIDO.....	124
FIGURA 67 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE	

	TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAGNO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO MATERIAL GENÉTICO AUMENTADO (PAINEL 1).....	125
FIGURA 68 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAGNO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO MATERIAL GENÉTICO AUMENTADO (PAINEL 2).....	126
FIGURA 69 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO MATERIAL GENÉTICO AUMENTADO.....	127
FIGURA 70 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAGNO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 1).....	128
FIGURA 71 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAGNO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 2).....	129
FIGURA 72 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 1).....	130
FIGURA 73 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO	

	POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 2).....	131
FIGURA 74 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A-HA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 1).....	132
FIGURA 75 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A-HA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 2).....	133
FIGURA 76 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A-HA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 3).....	134
FIGURA 77 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAGNO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E DOIS CINETOPLASTOS.....	135
FIGURA 78 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E DOIS CINETOPLASTOS.....	136
FIGURA 79 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A-HA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E DOIS CINETOPLASTOS.....	137
FIGURA 80 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO	

	DOIS NÚCLEOS E DOIS CINETOPLASTOS.....	138
FIGURA 81 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA MULTINUCLEADO.....	139
FIGURA 82 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAGNO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITAS APRESENTANDO FRAGMENTOS DE DNA.....	140
FIGURA 83 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA-FLAG NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA APRESENTANDO FRAGMENTO DE DNA.....	141
FIGURA 84 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA APRESENTANDO FRAGMENTO DE DNA (PAINEL 1).....	142
FIGURA 85 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA APRESENTANDO FRAGMENTO DE DNA (PAINEL 2).....	143
FIGURA 86 –	PARTICIPAÇÃO DE TcDLP NA CITOCINESE DO <i>Trypanosoma cruzi</i> (PAINEL 1).....	144
FIGURA 87 –	PARTICIPAÇÃO DE TcDLP NA CITOCINESE DO <i>Trypanosoma cruzi</i> (PAINEL 2).....	145
FIGURA 88 –	PARTICIPAÇÃO DE TcDLP NA CITOCINESE DO <i>Trypanosoma cruzi</i> (PAINEL 3).....	146
FIGURA 89 –	EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO <i>Trypanosoma cruzi</i> VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITAS	

	APRESENTANDO CINETOPLASTOS ARREDONDADOS....	147
FIGURA 90 –	PARTICIPAÇÃO DE TcDLP NA DIVISÃO MITOCONDRIAL. <i>T. cruzi</i> expressando TcDLPK39A-HA.....	148
FIGURA 91 –	FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS EM FORMA DE ANÉIS <i>IN VITRO</i> DA PROTEÍNA PURIFICADA Drp1.....	151
FIGURA 92 –	REDE DE TÚBULOS E VESÍCULAS QUE DIRECIONAM AS MOLÉCULAS ENDOCITADAS AO RESERVOSSOMO ATRAVÉS DE VESÍCULAS.....	153
FIGURA 93 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DURANTE O CICLO CELULAR DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	157
FIGURA 94 –	MODELO PROPOSTO DE PONTOS DE AÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ENDOCITOSE MEDIADA POR CLATRINA DURANTE A MITOSE.....	158
FIGURA 95 –	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA TUBULINA NO FUSO MITÓTICO E NA REDE SUBPELICULAR DE MICROTÚBULOS EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	160
FIGURA 96 –	ALTERAÇÃO NO COMPLEXO DE GOLGI DE CÉLULAS HeLa TRANSFECTADAS COM A DINAMINA MUTANTE K44A.....	161
FIGURA 97 –	PADRÃO DE EXPRESSÃO DE Drp-1 EM <i>C. elegans</i>	163
QUADRO 1 –	LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	37
QUADRO 2 –	MUTAÇÕES NA DINAMINA E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	107

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	ATIVIDADE GTPÁSICA DE TcDLPMAGMH391AAAAA/ ΔL4.....	83
GRÁFICO 2 –	PERFIL DA CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA SIMPLES NOCAUTE <i>T. cruzi</i> ^{idlp/Δdlp::neo}	92
GRÁFICO 3 –	METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE <i>T. cruzi</i> Dm28C TIPO SELVAGEM E <i>T. cruzi</i> SIMPLES NOCAUTE.....	93
GRÁFICO 4 –	CURVA DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS MUTANTES.....	111
GRÁFICO 5 –	CURVA DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS CONTROLE.....	112
GRÁFICO 6 –	ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CULTURAS EFEITO DOMINANTE NEGATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO...	119
GRÁFICO 7 –	ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CULTURAS EFEITO DOMINANTE NEGATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO...	120

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PERCENTUAL DE IDENTIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS TcDLP, TbDLP, LmDLP.....	77
TABELA 2 – ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CULTURAS EFEITO DOMINANTE NEGATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	118

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 SUPERFAMÍLIA DAS DINAMINAS	2
1.1.1 Dinaminas clássicas	2
1.1.2 Dinaminas não clássicas	4
1.2 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS DOMÍNIOS DAS DINAMINAS	6
1.3 ENTENDENDO OS DOMÍNIOS PARA ENTENDER SUAS FUNÇÕES	7
1.3.1 A região de haste, dimerização e a oligomerização	7
1.3.2 O domínio G e a atividade GTPásica	9
1.3.2.1 BSE e a região de haste	12
1.3.3 O domínio PH e sua interação com membranas	13
1.3.4 O domínio PH e a região de haste	16
1.4 MODELOS DE CISÃO DE MEMBRANAS	16
1.5 O <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	21
1.6 ENDOCITOSE EM TRIPANOSOMATÍDEOS	25
1.6.1 Endocitose em <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
1.7 A DINAMINA E O <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. PROCEDÊNCIA DOS MATERIAIS E REAGENTES	33
3.2 SOLUÇÕES	34
3.3 MEIOS DE CULTURA	35
3.4 CULTIVO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
3.4.1 Formas epimastigotas	36
3.4.2 Tripomastigotas metacíclicos	36

3.5 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS E MANIPULAÇÃO DO DNA.....	37
3.5.1 Construção de plasmídeos para deleção do gene <i>Tcdlp</i> por nocaute gênico.....	38
3.5.1.1 Amplificação e clonagem das regiões a montante e a jusante do gene <i>Tcdlp</i> no vetor pKS-neo.....	38
3.5.1.2 Amplificação e clonagem das regiões a montante e a jusante do gene <i>Tcdlp</i> no vetor pKS-higro.....	39
3.5.1.3 Amplificação dos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN para transfecção de <i>T. cruzi</i>	40
3.5.1.4 Amplificação e clonagem das regiões amino-terminal e carboxi-terminal de <i>Tcdlp</i> nos vetores pNEO2 e pHIGRO2.....	41
3.5.1.5 Amplificação dos cassetes N-DLPneoC-DLP e N-DLPhigroC-DLP para transfecção de <i>T. cruzi</i>	43
3.5.2 Expressão do gene <i>Tcdlp</i> utilizando sistema bacteriano.....	44
3.5.2.1 Clonagem do gene <i>Tcdlp</i> no vetor pGEX4T.....	44
3.5.2.2 Amplificação e clonagem de <i>Tcdlp</i> no vetor pET-46 Ek/LIC.....	44
3.5.2.3 Amplificação e clonagem do gene <i>Tcdlp</i> contendo a mutação MAGMH391-395AAAAA.....	45
3.5.2.4 Amplificação e clonagem do gene <i>Tcdlp</i> contendo a mutação Δ L4.....	47
3.5.2.5 Amplificação e clonagem do gene <i>Tcdlp</i> contendo a mutação MAGMH391-395AAAAA/ Δ L4.....	48
3.5.3 Construção de plasmídeos para os ensaios de efeito dominante negativo.....	48
3.5.3.1 Amplificação e clonagem do gene <i>Tcdlp</i> contendo a mutação K39A.....	48
3.5.3.2 Clonagem de <i>Tcdlpk39A</i> no vetor pGW-DDNterm utilizando a plataforma Gateway® (Invitrogen).....	49
3.5.3.3 Construção dos pNEO3xFlag e pNEO3xHA.....	52
3.5.3.4 Amplificação e clonagem do gene <i>Tcdlp</i> e seus mutantes nos vetores de expressão pNEO3xFlag e pNEO3xHA.....	53
3.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES...	55
3.6.1 Purificação da proteína recombinante GST-TcDLP.....	55

3.6.1.1 Teste de expressão e solubilidade de GST-TcDLP.....	55
3.6.1.2 Purificação de GST-TcDLP por lavagem de corpúsculos de inclusão...	56
3.6.2 Purificação das proteínas recombinantes clonadas no vetor pET46 Ek/LIC.....	57
3.6.2.1 Teste de expressão e solubilidade das proteínas recombinantes clonadas no vetor pET46 Ek/LIC.....	57
3.6.2.2 Expressão e purificação de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4 em larga escala.....	58
3.6.2.3 Expressão e purificação de His ₆ -TcDLP.....	59
3.7 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS CÁLCIO-COMPETENTES.....	60
3.8 TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES.....	61
3.8.1 Seleção dos clones recombinantes através da técnica da palitagem (<i>toothpick</i>).....	61
3.8.2 Seleção dos clones recombinantes através da técnica PCR de colônias.	62
3.9 PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS PRODUTOS DE PCR (MINIPREP).....	62
3.10 EXTRAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE UTILIZANDO PONTEIRA COM FILTRO.....	62
3.11 PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO FENOL/CLOROFÓRMIO.....	63
3.12 ANÁLISE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DE TcDLP.....	63
3.12.1 Ensaio de hidrólise de GTP.....	63
3.12.2 Ensaio de co-sedimentação de lipossomos.....	64
3.12.2.1 Preparação de lipossomos.....	64
3.12.3 Ensaio de tubulação de lipossomos.....	64
3.12.4 Medição da massa molecular de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4 por espalhamento de luz.....	65
3.13 TRANSFEÇÃO DE <i>T. cruzi</i>	65
3.14 EXTRATOS PROTÉICOS DE <i>T. cruzi</i>	66
3.15 OBTENÇÃO DE DNA DE <i>T. cruzi</i>	66
3.16 CONFIRMAÇÃO DA POPULAÇÃO SIMPLES NOCAUTE (<i>T. cruzi</i> ^{dip/Δdip::neo}) POR SOUTHERN BLOT.....	66

3.17 CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>T. cruzi</i>	67
3.18 OBTENÇÃO DE ANTISORO POLICLONAL CONTRA TcDLP.....	68
3.19 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>Tcdlp</i> E SEUS MUTANTES POR ENSAIO TIPO <i>WESTERN BLOT</i>	68
3.20 IMUNOLOCALIZAÇÃO POR FLUORESCÊNCIA.....	69
3.21 COLORAÇÃO DOS PARASITAS TRANSFECTANTES.....	69
3.22 ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DOS PARASITAS TRANSFECTANTES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	70
3.23 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	70
3.24 ENSAIO DE ENDOCITOSE POR CAPTAÇÃO DE TRANSFERRINA.....	71
4 RESULTADOS	72
4.1 CARACTERIZAÇÃO <i>in silico</i> DA TcDLP.....	72
4.2 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcDLP.....	77
4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DA TcDLP.....	81
4.4 ANÁLISE DA FUNÇÃO DE TcDLP <i>in vivo</i>	88
4.4.1 Nocaute gênico.....	88
4.4.2 Efeito dominante negativo.....	94
4.4.2.1 Efeito dominante negativo utilizando o sistema DD (Domínio desestabilizador).....	94
4.4.2.2 Efeito dominante negativo de diversos mutantes utilizando as etiquetas HA e FLAG.....	104
4.4.2.2.1 Ensaio de endocitose por captação de transferrina das culturas efeito dominante negativo.....	112
4.4.2.2.2 Análise das culturas mutantes com efeito dominante negativo por citometria de fluxo.....	117
4.4.2.2.3 Análise do efeito dominante negativo por imunofluorescência.....	121
5 DISCUSSÃO	149
6 CONCLUSÕES	164
7 REFERÊNCIAS	165

1 INTRODUÇÃO

Endocitose é o processo através do qual as células internalizam porções de sua membrana plasmática, juntamente com o material extracelular. Esse processo é de fundamental importância na fisiologia celular, já que equilibra a entrega contínua de membrana à superfície da célula por exocitose, regula a abundância de proteínas da membrana plasmática, controla a transdução de sinal por remoção e degradação de receptores de sinalização, medeia a captação celular de nutrientes e, também, é explorado por agentes patogênicos para entrar nas células. Para manter essas várias funções, distintas formas de endocitose, tanto constitutivas quanto reguladas, fazem-se presentes nas células MERCER *et al.*, 2010; SCITA; DI FIORI, 2010; (FERGUSON; DE CAMILLI, 2012).

A geração de uma vesícula endocítica requer recrutamento de várias proteínas do citosol. Estas proteínas orquestram uma dobra, para dentro, da membrana plasmática formando um “botão” fortemente invaginado e, subsequentemente, promovem sua cisão. Uma destas proteínas, que participa diretamente nessa reação de fissão, é a dinamina, membro fundador de uma família de GTPases, as quais possuem diversos papéis em eventos de remodelação de membranas nas células. O papel da dinamina na endocitose tem sido investigado há mais de 20 anos (FERGUSON; DE CAMILLI, 2012; SHPETNER; VALLE, 1989). A figura 1 representa o papel mais estudado da dinamina, a qual descreve a sua participação na liberação de vesículas revestidas por clatrina.

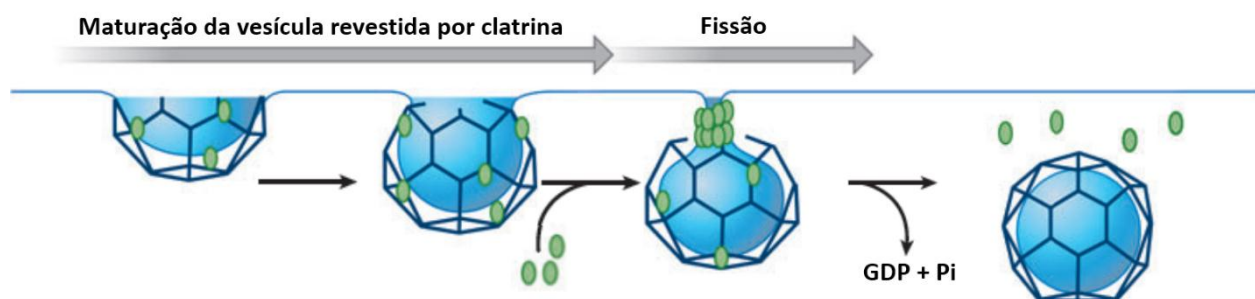


FIGURA 1 - PAPEL DA DINAMINA NA ENDOCITOSE MEDIADA POR CLATRINA. A dinamina é recrutada para a vesícula em brotamento, onde atua na monitoração e regulação da maturação da vesícula revestida por clatrina. Uma explosão transiente de dinamina (representado em verde), provavelmente, refletindo sua montagem em forma de colar no gargalo da vesícula, ocorre momentos antes da fissão da membrana e

liberação da vesícula. Pi - fosfato inorgânico.
FONTE: Adaptado de Schmid & Frolov, 2011.

1.2 SUPERFAMÍLIA DAS DINAMINAS

As proteínas que fazem parte dessa família são GTPases de alto peso molecular (~100 kDa) e, geralmente, são denominadas de enzimas “mecanoquímicas”, já que acoplam a hidrólise de GTP com a geração da deformação mecânica de membranas celulares. Os membros dessa família compartilham várias características bioquímicas, tais como afinidade relativamente baixa a nucleotídeos, alta taxa de atividade basal, possuem capacidade de tubular lipossomos negativamente carregados, exibem capacidade de se oligomerizar em forma de anéis e a hidrólise de GTP é estimulada em resposta à essa oligomerização (WARNOCK; SCHMID, 1996; PRAEFCKE; MCMAHON, 2004; INGERMAN *et al.*, 2007).

1.2.1 Dinaminas clássicas

As dinaminas clássicas estão envolvidas, principalmente, na cisão de vesículas endocíticas, revestidas por clatrina, formando uma estrutura em forma de anel em torno do pescoço da vesícula em brotamento. A atividade GTPásica é de fundamental importância para a liberação da vesícula da membrana plasmática (PRAEFCKE; MCMAHON, 2004; METTLEN *et al.*, 2009; SCHMID; FROLOV, 2011; FERGUSON; DE CAMILLI, 2012; BRAMKAMP, 2012).

O genoma de mamíferos possui três genes de dinamina (CAO *et al.*, 1998). As proteínas codificadas por esses genes compartilham a mesma organização de domínios e 80% de homologia global, porém possuem distintos padrões de expressão. Dinamina 1 é seletivamente expressa em níveis elevados em neurônios (FERGUSON *et al.*, 2007; NAKATA, 1991); dinamina 2 é expressa ubiquamente (FERGUSON *et al.*, 2007; COOK *et al.*, 1994) e a dinamina 3 é encontrada, predominantemente, no cérebro (em níveis muito mais baixos do que dinamina 1), testículos e, com menores níveis, em alguns tecidos como, por exemplo, o pulmão (CAO *et al.*, 1998; FERGUSON *et al.*, 2007; RAIMONDI, 2011). Essa diversidade ainda é maior, pois, adicionalmente, ocorre *splicing*

alternativo dos produtos desses três genes, gerando uma multiplicidade de variantes (CAO *et al.*, 1998; RAIMONDI *et al.*, 2011, FERGUSON; DE CAMILLI, 2012).

Alguns invertebrados como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* possuem apenas um gene de dinamina (CLARK *et al.*, 1997; FERGUSON; DE CAMILLI, 2012). Portanto, a existência de três genes de dinamina em mamíferos poderia, em princípio, refletir as diferenças entre a função constitutiva da dinamina 2 na endocitose mediada por clatrina (CME, de *clathrin-mediated endocytosis*) e as formas especializadas de endocitose em células que adicionalmente expressam as dinaminas 1 e/ou 3. Além disso, essa triplicação do gene da dinamina durante a evolução pode ser parcialmente explicada pela necessidade de ajustar os níveis gerais da dinamina em tecidos específicos (FERGUSON; DE CAMILLI, 2012). As diferentes isoformas da dinamina possuem algumas interações proteína-proteína exclusivas (XUE *et al.*, 2011; BODMER *et al.*, 2011; PIZZATO *et al.*, 2007; GRAY *et al.*, 2003). No entanto, a maior parte das diferenças entre as isoformas são quantitativas e não qualitativas. Algumas dessas diferenças são: a afinidade por proteínas que contêm o domínio SH3 (RAIMONDI *et al.*, 2011), taxa de atividade GTPásica, eficiência na oligomerização e propriedades de ligação a lipídios (LIU *et al.*, 2011). Segundo Liu *et al.* (2011), diferenças nas características de ligação a lipídios das dinaminas 1 e 2 causam considerável diferença nas suas atividades de fissão de membranas.

As dinaminas clássicas possuem cinco domínios característicos: um domínio GTPase, um domínio central, um domínio homólogo a plecstrina (PH), um domínio GED e um domínio rico em prolina (PRD).

Com base na sua sequência primária, dinamina tem sido descrita compreendendo os seguintes domínios: um domínio GTPase N-terminal (domínio G) altamente conservado, assim como um domínio central α -helicoidal e um domínio efetor da GTPase (GED). As dinaminas clássicas possuem também um domínio de ligação a lipídeos homólogo a plecstrina (PH) e o domínio C-terminal rico em prolina (PRD) (FERGUSON; DE CAMILLI, 2012; SCHMID; FROLOV, 2011). Geralmente esse domínio contém 36 prolina entre 110 aminoácidos, o que faz com que possa se ligar a domínios SH3 de muitas proteínas acessórias, entre elas a anfisina, SNX9 e outros parceiros que possuem o domínio BAR. (SHUPLIAKOV *et al.*, 1997; STOWELL *et al.*, 1999;

SWEITZER; HINSHAW, 1998; ZHANG; HINSHAW, 2001; SOULET *et al.*, 2005; FERGUSON; DE CAMILLI, 2012, FAELBER *et al*, 2012).

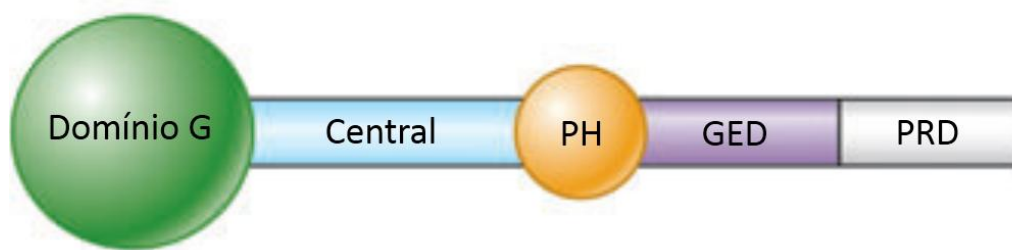


FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA DINAMINA. (PH) Domínio homólogo a plectrina, (GED) Domínio Efetor da GTPase, (PRD) Domínio rico em prolina.
FONTE: Modificado de Schmid e Frolov (2011).

1.2.2 Dinaminas não clássicas

Essa classe de proteínas também é conhecida como *dynamamin-like proteins* (DLPs) ou *dynamamin related proteins* (DRPs).

Estas proteínas perderam o domínio PRD e o domínio PH, mas contudo possuem domínios adicionais característicos de cada DLP (MASUD RANA *et al.*, 2013). Essas proteínas estão envolvidas em vários eventos de remodelação de membranas (BRAMKAMP, 2012), tais como fusão e fissão da mitocôndria, divisão de cloroplastos e peroxissomos, fusão do retículo endoplasmático, divisão celular e também a resistência a infecções virais (MASUD RANA *et al*, 2013).

É importante ressaltar que as regiões que corresponderiam aos domínios PH e PRD das dinaminas clássicas são particulares pra cada DLP. Essa particularidade é que faz com que essas proteínas possuam funções diferentes, participando de diversos eventos celulares citados no parágrafo anterior.

Dentro dessa família, algumas proteínas atuam de maneira similar à dinamina, mediando a fissão de membranas. Exemplificando, a Drp1 (de *Dynamamin related protein 1*) é importante para a fissão de mitocôndrias e peroxissomos. Outras proteínas são membros mais distantes dessa família e medeiam a fusão de membranas homotípicas (DETMER; CHAN, 2007; HOPPINS *et al.*, 2007; OKAMOTO; SHAW, 2005;

WESTERMANN, 2010; FERGUSON; DE CAMILLI, 2012). É o caso da proteína mitofusina, que controla a fusão da membrana externa mitocondrial, a proteína OPA1 (de *optic atrophy 1*), que é importante na fusão da membrana interna mitocondrial e a atlastina, que participa em eventos de fusão de membranas do retículo endoplasmático (DETMER; CHAN, 2007; HOPPINS *et al.*, 2007; OKAMOTO; SHAW, 2005; WESTERMANN, 2010; FERGUSON; DE CAMILLI, 2012; HU *et al.*, 2009; ORSO *et al.*, 2009, MOSS *et al.*, 2011).

Também se incluem nessa família, com base nas suas estruturas e propriedades de montagem, as proteínas antivirais Mx (*myxovirus resistance proteins*) (HALLER *et al.*, 2010; FERGUSON; DE CAMILLI, 2012) e as GBPs (de *guanilate binding proteins*), cuja exata função permanece desconhecida (PRAKASH *et al.*, 2000; FERGUSON; DE CAMILLI, 2012).

As DLPs em plantas controlam o tráfego de membranas durante a formação da placa celular na citocinese (GU; VERMA, 1996) e medeiam a divisão de cloroplastos (LOW *et al.*, 2009; MIYAGISHIMA *et al.*, 2003, FERGUSON; DE CAMILLI, 2012). A BDLP (de *bacterial dynamin like protein*) também é importante no processo de remodelação de membrana (LOW; LÖWE, 2006; LOW *et al.*, 2009; FERGUSON; DE CAMILLI, 2012; BRAMKAMP, 2012).

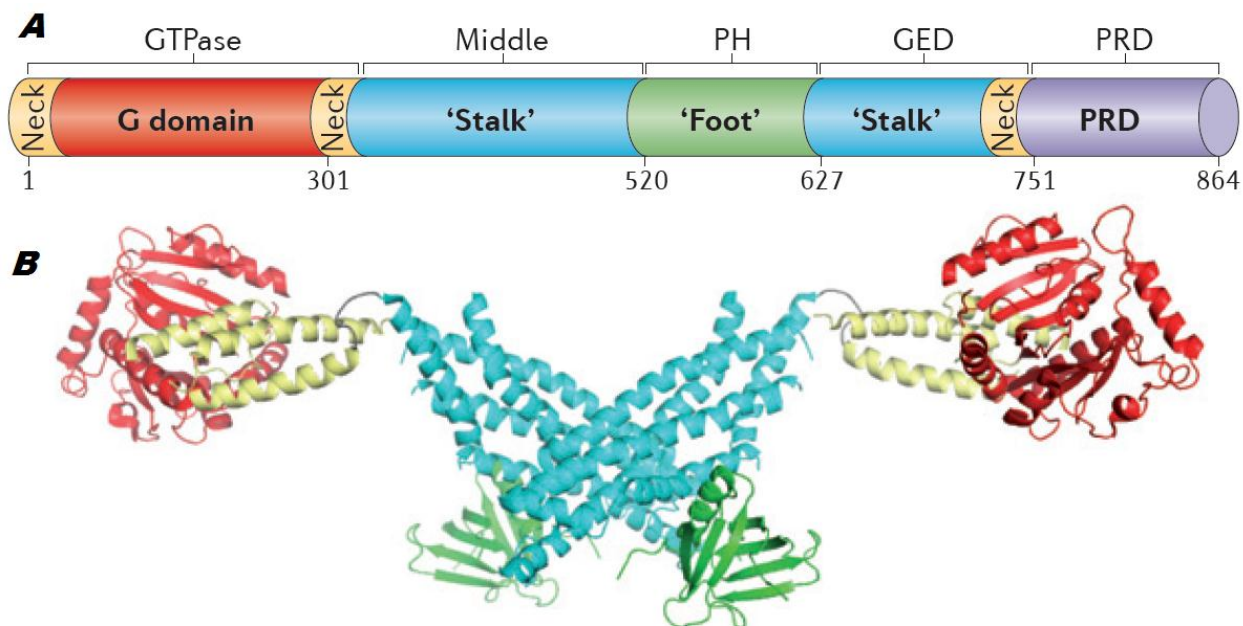
Além dessas, a EHD, que se difere das outras DLPs por ser uma ATPase, compartilha similaridades estruturais e, também, está envolvida na remodelagem de membranas (DAUMKE *et al.*, 2007, FERGUSON; DE CAMILLI, 2012).

Mutações nas DLPs, mais especificamente nas DLPs que participam de processos que afetam a dinâmica na mitocôndria e no retículo endoplasmático, têm sido identificadas como causadoras de doenças hereditárias, tais como atrofia óptica do tipo 1 (mutações em OPA1) (DELETTRE *et al.*, 2000), neuropatia hereditária sensitiva motora ou Charcot-Marie-Tooth tipo 2A (mutações na mitofusina 2 – MFN2) (ZUCHNER *et al.*, 2004), paraplegia espástica familiar (mutações na atlastina) (ZHAO *et al.*, 2001). Foi reportado um caso, por Waterham e colaboradores (2007), de um bebê que faleceu com 37 dias e que, após uma profunda investigação, observaram que a fissão de mitocôndria e peroxissomos era defeituosa e foi descoberta uma mutação dominante negativa heterozigota no gene que codifica a proteína DLP1.

1.2 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS DOMÍNIOS DAS DINAMINAS

Mais recentemente, com as informações obtidas de estruturas cristalográficas da dinamina e DLPs (CHAPPIE *et al.*, 2010; FAELBER *et al.*, 2011; FORD *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2010; BIAN, 2011; BYRNES, 2011), pode-se modificar as definições dadas aos domínios da proteína e que agora refletem melhor sua estrutura tridimensional em forma de grampo (FERGUSON; DE CAMILLI, 2012) (Figura 3A).

Essas estruturas cristalográficas (figura 3B) mostraram que o domínio central (*Middle*) e o domínio GED formam um feixe de hélices (haste, *stalk* ou *trunk*) que se conectam com o domínio GTPase (G domain) por meio de um ligante (*linker*) intitulado “pescoço” (*Neck*) ou “feixe de sinalização” (BSE, de *bundle signaling elemento*). Assim, a estrutura seria composta por: domínio G (*G domain*), pescoço/BSE, haste/*stalk/trunk* e o domínio PRD de ligação a lipídeo (BRAMKAMP, 2012). Ainda não se conseguiu obter a estrutura cristalográfica da dinamina contendo a região que corresponderia ao domínio PRD.



FONTE: Ferguson e De Camilli (2012).

O domínio G se localiza acima do BSE (CHAPPIE *et al.*, 2010), o qual é formado por três hélices derivadas das sequências N e C-terminal do domínio G e da região C-terminal do domínio GED. Depois do BSE segue a região de haste o qual é formado por hélices do domínio central e da região N-terminal do GED (GAO *et al.*, 2010; FAELBER *et al.*, 2011; FORD *et al.*, 2011) e o domínio PH (FERGUSON, 1994), o qual forma o vértice ou “pé” (Foot) do grampo e que se liga a membranas. A ativação da hidrólise de GTP é mediada pela dimerização do domínio G e a informação conformacional é transferida para a haste pelo BSE (CHAPIE *et al.*, 2010; BRAMKAMP, 2012). O domínio PRD emerge na fronteira entre o domínio G e o BSE, e é provável que se projete para longe da membrana onde possa interagir com outras proteínas (FERGUSON; DE CAMILLI, 2012).

1.3 ENTENDENDO OS DOMÍNIOS PARA ENTENDER SUAS FUNÇÕES

1.3.1 A região de haste, dimerização e a oligomerização

Recentemente, estudos cristalográficos forneceram uma descrição detalhada dos mecanismos moleculares que levam à oligomerização da dinamina, surgindo, assim, modelos que tentam explicar como essa proteína atua no gargalo ou no pescoço de uma vesícula em brotamento (FAELBER *et al.*, 2012).

Esses estudos mostraram que a região de haste ou *stalk* é o ponto central que medeia a oligomerização da dinamina em filamentos. Duas dessas regiões se montam em forma de cruz através de uma interface central (interface 2) altamente conservada (GAO *et al.*, 2010, FAELBER *et al.* 2011; FAELBER *et al.*, 2012) (FIGURA 4). A montagem, via essa interface, resulta na formação de um dímero estável. Mutações na interface 2 na dinamina-like MxA resultam em uma proteína monomérica que não é capaz de se oligomerizar (GAO *et al.*, 2010; FAELBER *et al.*, 2012), indicando que essa interface tem um papel fundamental na formação do dímero. As mutações correspondentes na dinamina 1 resultam em uma proteína insolúvel (FAELBER *et al.*, 2011; FAELBER *et al.*, 2012). Esses estudos cristalográficos, mostraram que além de

serem formados pela interface 2, esses dímeros se oligomerizam por duas interfaces adicionais, as interfaces 1 e 3 (GAO *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2011; FAELBER *et al.*, 2011; FORD *et al.*, 2011; FAELBER *et al.*, 2012) (FIGURA 4A). Portanto, a tetramerização e a oligomerização da dinamina e da dinamina-like MxA se dão por essas duas interfaces. Em concordância com esse modelo, mutações nas interfaces 1 e 3 de MxA e na interface três da dinamina 1 resultam na formação de dímeros estáveis que são incapazes de se oligomerizarem (FAELBER *et al.*, 2012).

A interface 1 se localiza próximo ao domínio G e ao BSE, já a interface 3 se localiza na extremidade distal da haste (FIGURA 4A).

A interface 1 é na sua maioria hidrofóbica e relativamente plana (Figura 4B). Isso sugere que essa interface possa funcionar como um eixo, controlando o ângulo entre dois dímeros e, portanto, os oligômeros de dinamina, os quais tendem a formar hélices, podem ajustar o diâmetro e o aumento destas hélices (FAELBER *et al.*, 2012).

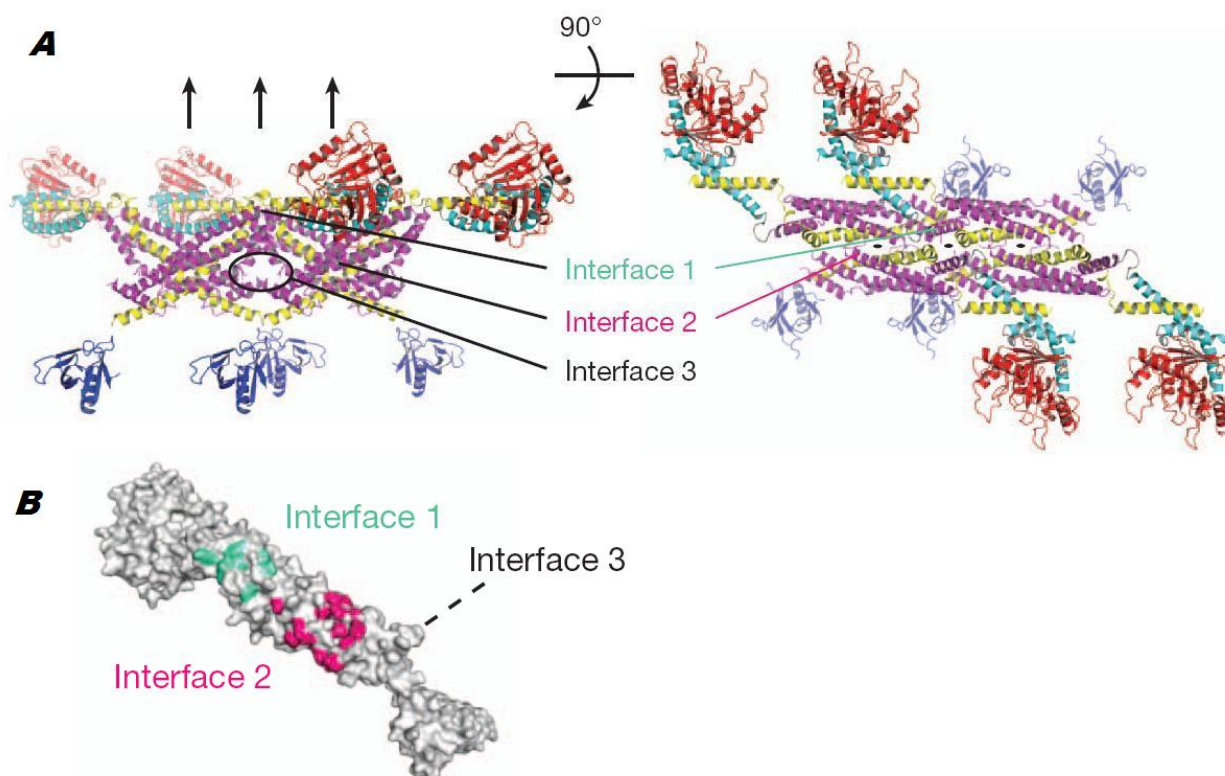


FIGURA 4 – INTERFACES DE DIMERIZAÇÃO E OLIGOMERIZAÇÃO. Em A podemos ver um tetrâmero de dinamina em dois diferentes ângulos. A interface 2 é responsável pela dimerização. As interfaces 1 e 3 são responsáveis pela oligomerização. Em B temos a representação da superfície da dinamina evidenciando as interfaces 1 e 2.

FONTE: Ford et al., (2011).

Mutações na interface 3 de MxA impedem sua montagem em estruturas em formas de hélices ou anéis e são pré-requisitos para sua cristalização (GAO *et al.*, 2011; FAELBER *et al.*, 2011; FORD *et al.*, 2011; FAELBER *et al.*, 2012). Simulações por dinâmica molecular sugerem que os rearranjos nas montagens das interfaces 1e 3 permitem que a dinamina forme hélices de diferentes ângulos e diâmetros (FAELBER *et al.*, 2011) (FIGURA 5). Isso pode explicar como a dinamina é capaz de se oligomerizar em torno de vários alvos lipídicos de diferentes diâmetros (BASHKIROV *et al.*, 2008; ROUX *et al.*, 2010, FAELBER *et al.*, 2012).

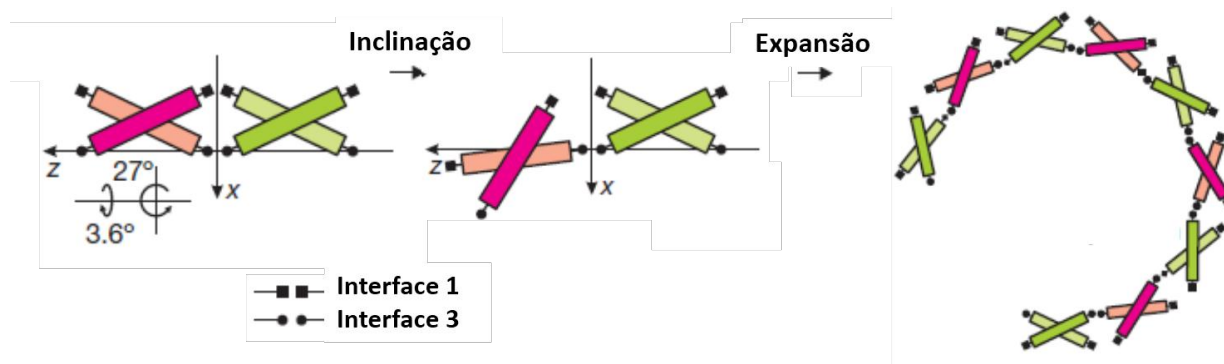


FIGURA 5 – MODELO DE OLIGOMERIZAÇÃO DA DINAMINA EM FORMA DE HÉLICES. Estão representadas duas regiões de haste dimerizadas (rosa e verde). A hélice pode ser formada pela possibilidade de ocorrer um pequeno deslocamento e uma inclinação de um dímero em relação ao outro. FONTE: modificada de Ford *et al.*, (2011).

1.3.2 O domínio G e a atividade GTPásica

A característica principal das dinaminas é sua capacidade de se ligar e hidrolisar GTP (algumas DLPs utilizam ATP). O domínio de ligação a nucleotídeos (domínio G) é o domínio mais conservado da arquitetura das dinaminas e DLPs. Estas proteínas pertencem a classe TRAFAC (translation factor) das P-loop GTPases, na qual estão incluídas enzimas envolvidas com tradução (fatores de tradução), transdução de sinais (pequenas proteínas G, especialmente a subfamília Ras), motilidade celular e transporte intracelular (LEIPE *et al.*, 2002). O domínio G contém quatro motivos bem caracterizados

(G1-4) e o motivo G5, que é menos conservado (LEIPE *et al.*, 2002, BRAMKAMP, 2012).

O motivo G1, também conhecido por P-loop, é altamente conservado (GxxxxGK[ST]). O domínio G2 também é conhecido por “Switch I” e tem como característica a presença de um resíduo de treonina altamente conservado. O motivo G3 ou “Switch II” possui a sequência (DxxG) conservada e o motivo G4 possui o consenso [NT]KxD (LEIPE *et al.*, 2002; BRAMKAMP, 2012). Esses consensos estão exemplificados na FIGURA 6.

	G1 (P-loop)	G2 + switch I	G3 + switch II	G4
Ras	LVVV G AGGV GKS ALTIQLIQ	EYDP T IEDSY	IL D TA G QEEY	VG NKCDL
Dynamina1	IAVV G GQS A G K SSVLENFVG	SGIV T RRPLV	LV D L P G M TKV	VI TKL DL
DLP1	IVVV G TQSS GKS SVLESVVG	TGIV T RRPLI	LV D L P G M TKV	VI TKL DL
MxA	IAVI G DQSS GKS SVLEALSG	SGIV T RCPLV	LI D L P G I TRV	IL TKP DL
OPA1	VVVV G DQS A G K TSVLEMIAQ	GEMM T RS P VK	LV D L P G V INT	VL TKV DL
Mitofusina1	VAFF G RTSS GKS SVINAMLW	IGHI T NCFLS	LV D SP G TDVT	LN NRW DA
hGBP1	VAIV G LYRT GKS YLMNKLGA	VQSH T KGIWM	LL D TE G LGDV	VW TLR DF
BDLP	LLVL G DMKR GKS TFLNALIG	VNPCTAVLTV	IV D SP G LN D T	LV N AW D Q
DynA D1	IAFT G HYS A G K SSLNCLLM	SPI P T S ANLV	YI D TP G IDST	IV N Q I DR
DynA D2	LAL F G G FSS GKS SFANALVG	PTPT T ATINK	IV D TP G ASSM	II N A A DL
Consensus	GxxxxGKS T	T	DxxG	NKxD TRxD

FIGURA 6 – ALINHAMENTO DE DOMÍNIOS GTPase MOSTRANDO OS QUATRO MOTIVOS CONSERVADOS. Os resíduos críticos estão destacados em azul. Ras (*Homo sapiens*), Dinamina1 (*Homo sapiens*), DLP1 (*Arabidopsis thaliana*), MxA (*Homo sapiens*), OPA1 (*Drosophila melanogaster*), Mitofusina1 (*Homo sapiens*), hGBP1 (*Homo sapiens*), BDLP (*Nostoc punctiforme*), DynA (*Bacillus subtilis*).

FONTE: modificado de Bramkamp (2012).

Os membros da família das dinaminas pertencem a uma classe de proteínas G que são ativadas pela dimerização dependente de nucleotídeo (LOW; LÖWE, 2010; BRAMKAMP, 2012).

De acordo com estudos cristalográficos, foi demonstrado que a atividade GTPásica da dinamina é desencadeada pela dimerização, GTP dependente, do domínio G através de uma interface altamente conservada no sítio de ligação a nucleotídeo (CHAPPIE *et al.*, 2010; CHAPPIE *et al.*, 2011; FAELBER *et al.*, 2012). Essa interface inclui o switch I, switch II e o loop G4 (FAELBER *et al.*, 2012).

A ativação da atividade GTPásica requer rearranjos estruturais que permitam o

ataque nucleofílico sobre o fosfato γ , a compensação de cargas (neutralização da carga negativa que é gerada entre os fosfatos β e γ no estado de transição) e a estabilização dos motivos G2 e G3 (CHAPPIE *et al.*, 2010; BRAMKAMP, 2012).

O resíduo de lisina (K44) do P-loop contribui para a compensação de cargas, coordenando com os fosfatos β e γ do nucleotídeo. A mutação do resíduo de lisina do P-loop leva à perda da capacidade dessas proteínas de ligar e hidrolisar GTP. Mutações no P-loop embora levem a alterações da atividade GTPásica, não interferem na capacidade do domínio G de formar dímeros e se oligomerizar (CHAPPIE *et al.*, 2010; BRAMKAMP, 2012).

A afinidade de dimerização dos domínios G na sua forma ligada a GDP parece ser baixa, levando a sua dissociação (CHAPPIE *et al.*, 2010; FAELBER *et al.*, 2012).

De acordo com o nucleotídeo ligado (GTP ou GDP), a região BSE (*bundle signalling element*) assume uma certa posição relativa ao domínio G (CHAPPIE *et al.*, 2010). Ou seja, quando o domínio G está ligado ao GTP, o BSE assume uma conformação aberta ou estendida, enquanto que, quando está ligado ao GDP, BSE assume uma conformação mais fechada. Nessa conformação mais fechada, a hélice $\alpha 1$ do BSE interage com o domínio G através de múltiplos contatos (interface seis). Essa conformação mais fechada também é encontrada em estruturas livres de nucleotídeo (FAELBER *et al.*, 2012). Ainda não se sabe a localização do BSE durante a hidrólise de GTP. Mutações nessa interface seis leva a uma agregação não específica da dinamina (FAELBER *et al.*, 2011).

Modelos baseados em reconstruções por microscopia eletrônica indicam que a dimerização do domínio G não ocorre dentro do filamento de dinamina montado via região de haste, mas sim, entre a volta vizinha da hélice de dinamina (GAO *et al.*, 2010; CHAPPIE *et al.*, 2011). Essa situação pode estar melhor representada na FIGURA 7.

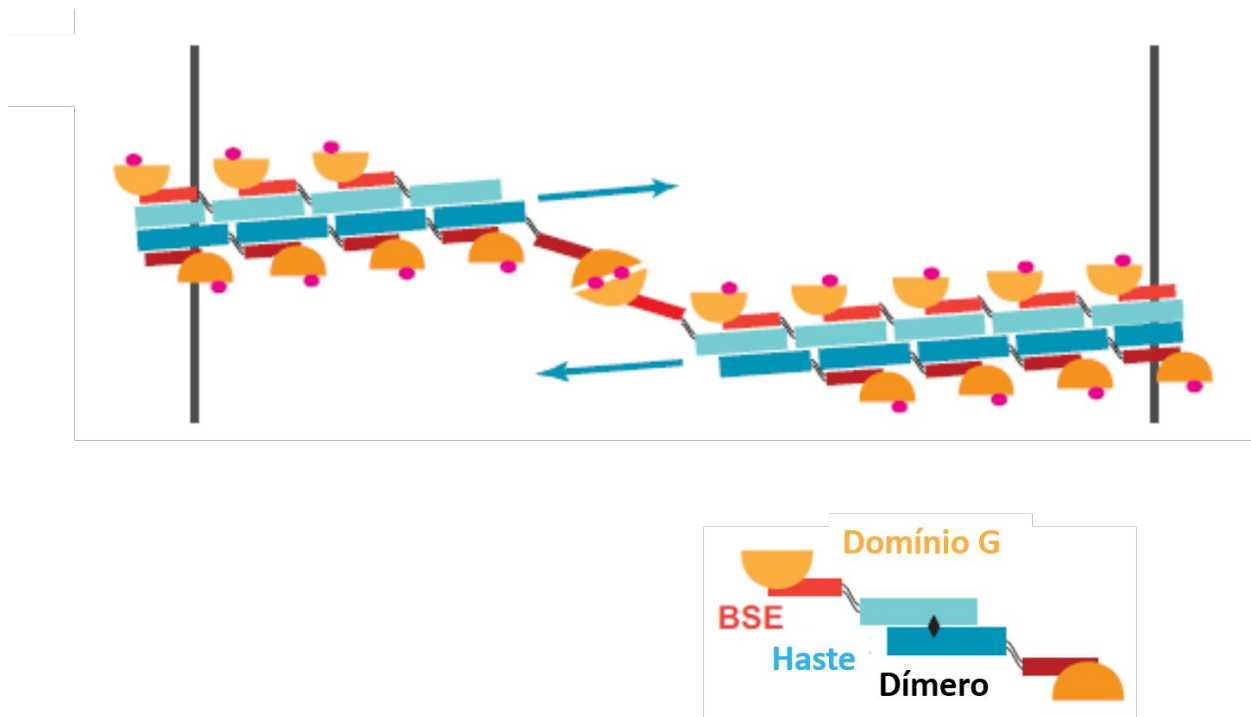


FIGURA 7 – DIMERIZAÇÃO DO DOMÍNIO G. Os domínios G terminais podem se dimerizar quando a hélice completa uma volta.

FONTE: Faelber *et al.* (2012).

A dimerização do domínio G ocorre apenas quando uma volta completa da hélice é concluída. Essa característica é importante pelo seu mecanismo de ação do processo de remodelação de membranas (FAELBER *et al.*, 2012).

1.3.2.1 BSE e a região de haste

De acordo com as informações obtidas por cristalografia, a região BSE de um dímero de dinamina interage com a região de haste do dímero vizinho. Essa interação foi denominada de interface cinco. Mutações nessa interface levam ao aumento da taxa de endocitose, mediada por dinamina, sugerindo, então, que essa interação tem um papel regulatório na função da proteína (FAELBER *et al.*, 2011). Comparações entre os dados de cristalografia e modelos baseados em reconstrução por microscopia eletrônica de um oligômero de dinamina sugerem que essa interface se abra durante a oligomerização, permitindo que o domínio G de um filamento se dimerize com o filamento vizinho da hélice (a FIGURA 12 explicará melhor esse evento).

A interface cinco também pode estar envolvida na transdução das alterações conformacionais, causadas pelo estado de ligação a nucleotídeos (GTP, GDP ou livre de nucleotídeo), no domínio G para a região de haste do dímero vizinho (FAELBER *et al.*, 2012).

1.3.3 O domínio PH e sua interação com membranas

Como já citado anteriormente, o domínio PH está presente nas dinaminas clássicas. Esse domínio se liga a fosfolipídeos (em particular o fosfatidilinositol 4,5 - bifosfato - PI(4,5)P₂ e o fosfatidilinositol 3, 4, 5 - trifosfato - PI(3,4,5)P₃), no lado citosólico da membrana plasmática, através de uma superfície carregada positivamente. Essa característica permite a ligação dirigida das dinaminas em membranas ricas em fosfoinosítídeos (FERGUSSON, *et al.*, 1994; ZHENG *et al.*, 1996; DOWNING *et al.*, 1994; RAMACHANDRAN *et al.*, 2009; FORD, 2011; BRAMKAMP, 2012). Essa ligação com a membrana alvo é que promove a curvatura necessária para que ocorra a invaginação da bicamada lipídica, ou, no caso das DLPs, favorece uma propriedade específica (RAMACHANDRAN *et al.*, 2009; GASPER *et al.*, 2009; FERGUSSON; DE CAMILLI, 2012).

Como se pode perceber pelas figuras 8 e 9, o domínio PH está envolto pela região de haste. As DLPs desenvolveram diferentes mecanismos de ligação a membranas. Por exemplo, as mitofusinas, OPA1 (Mgm1) e as atlastinas possuem hélices transmembranas que ancoram permanentemente na membrana alvo (BRAMKAMP, 2012). Em contraste, a GBP1 (de *guanilate-binding protein*) tem um motivo chamado de “CaaX box”, onde isoprenóides são ligados a uma cisteína conservada. Esse motivo é precedido por outro motivo polibásico que favorece essa ligação com fosfolipídeos de carga negativa (FRES *et al.*, 2010). No entanto, nem todas GBPs possuem o motivo “CaaX box” e o mecanismo de ligação a membranas dessas proteínas permanecem não elucidados (BRAMKAMP, 2012). As proteínas antivirais Mx se ligam a membranas através de um *loop* exposto, identificado como “loop quatro” (VON DER MALSBURG *et al.*, 2011). A ATPase EHD (membro da superfamília das dinaminas, porém mais distantemente relacionada) também possui um *loop* exposto que é capaz de se ligar a membranas (DAUMKE *et al.*,

2007). As dinaminas de bactérias compartilham esse mesmo mecanismo de ligação. A estrutura cristalográfica da BDLP revelou um domínio identificado como “pá” ou “paddle” que se insere na bicamada lipídica através de um loop (LOW *et al.*, 2009; BRAMKAMP, 2012).

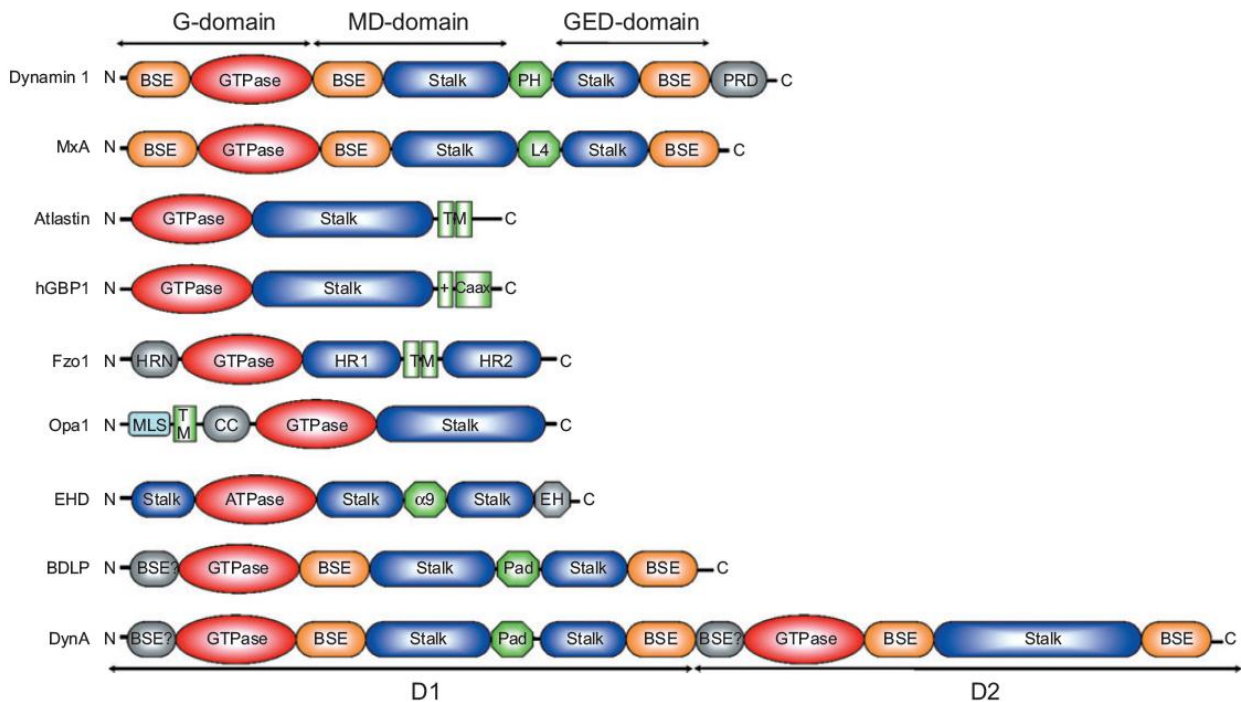


FIGURA 8 – ARQUITETURA DOS DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS MEMBROS DA SUPERFAMÍLIA DAS DINAMINAS. A representação dos domínios está baseada nas estruturas tridimensionais da proteínas. A nomenclatura clássica está mostrada na parte superior da figura (G-domain, domínio G; MD-domain, domínio central; GED-domain, domínio efetor da GTPase). Os domínios que estão representados em verde são os que fazem com que a proteína se ligue a membranas e possuem características próprias de acordo com sua função celular. BSE (feixe de sinalização ou *bundle signaling element*), GTPase (Domínio GTPase ou domínio G), Stalk (haste, tronco ou *trunk*), PH (domínio homólogo a plestrina), PRD (domínio rico em prolina), L4 (loop 4), TM (hélices transmembrana), HRN (motivo *coiled-coil* N-terminal de mitofusina, vem de *heptad repeat*), HR1 e HR2 (motivos *coiled-coil*), MLS (sinal de localização mitocondrial), CC (motivo *coiled-coil*), $\alpha 9$ (loop hélice 9), EH (domínio homólogo a Eps15), Pad (de *paddle* ou pá). Fzo1 é uma mitofusina de *Saccharomyces cerevisiae*. DynA é uma DLP de *Bacillus subtilis*.

FONTE: Bramkamp (2012)

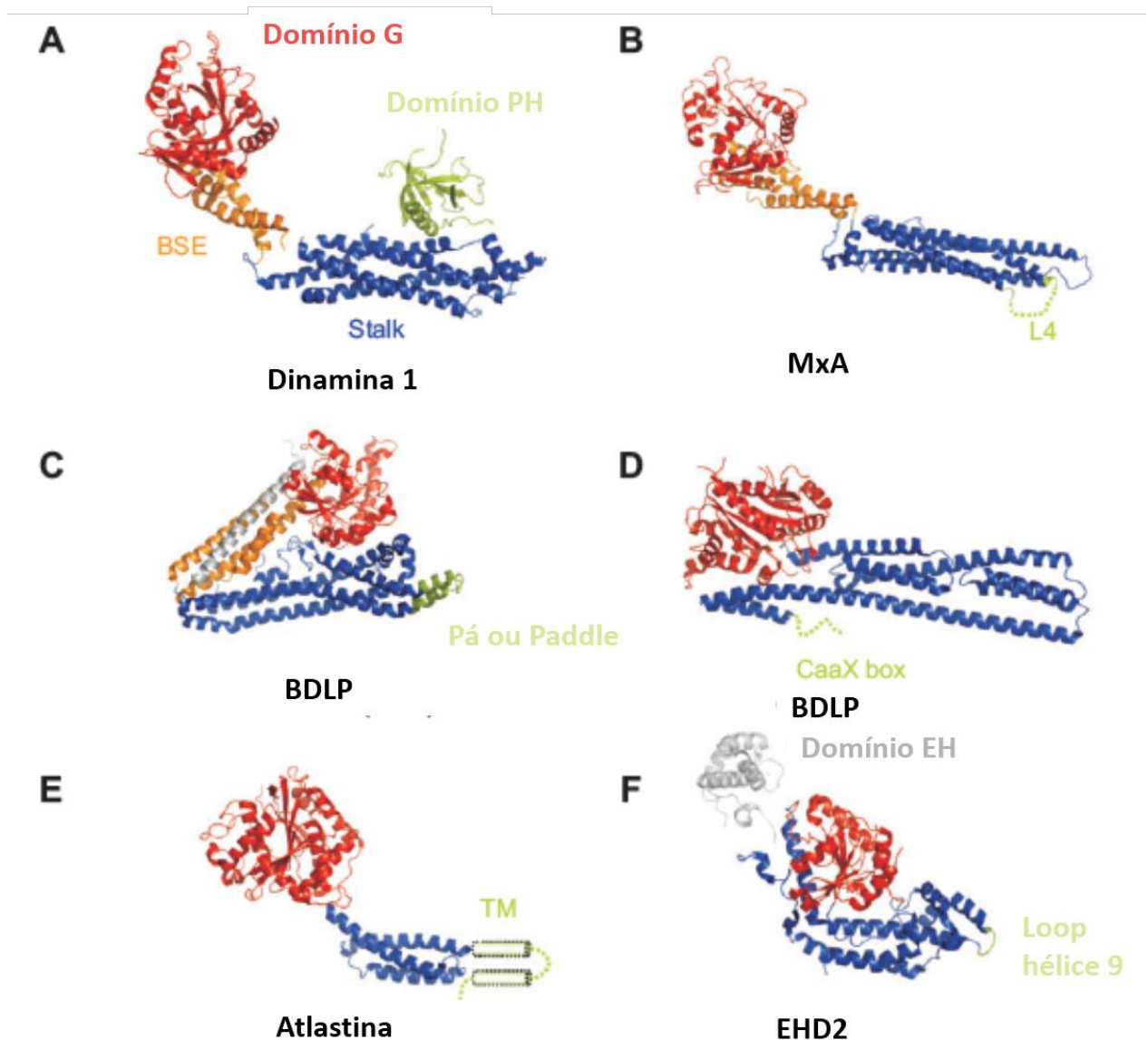


FIGURA 9 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE MEMBROS DA SUPERFAMÍLIA DAS DINAMINAS. Os nomes das proteínas estão indicados abaixo de cada estrutura. Todas as estruturas mostram que essas proteínas possuem características estruturais conservadas. São comuns em todas as estruturas: o domínio G (em vermelho), região de haste que é composto por hélices (em azul) e uma região de ligação a lipídeos (em verde). Essas regiões podem ser hélices transmembranas (TM) ou loops expostos (L4, hélice nove), sítios de isoprenilação (CaaX) e o domínio paddle ou pá (Pad).
FONTE: modificado de Bramkamp (2012)

Como se pode perceber na FIGURA 9, os membros da família das dinaminas compartilham o mesmo desenho, com um módulo ou região de ligação a membranas exposto na dobra da região de haste (BRAMKAMP, 2012).

Mutações no domínio PH que impedem a ligação a fosfolipídeos exercem um efeito dominante negativo na endocitose mediada por clatrina (LEE *et al.*, 1999; VALLIS

et al., 1999; FERGUSON; DE CAMILLI *et al.*, 2012).

Vale ressaltar também que, em solução, o domínio PH é monomérico e a afinidade de ligação desse monômero, por membrana, é baixa (KLEIN *et al.*, 1998). Deste modo, pelo menos dois domínios PH interconectados são necessários para aumentar a avidéz dessa interação (FERGUSON; DE CAMILLI *et al.*, 2012, FAELBER *et al.*, 2012).

1.3.4 O domínio PH e a região de haste

Pelos estudos cristalográficos, também foi visto que o domínio PH interage com a região de haste e acredita-se que possa ter um importante papel na regulação da oligomerização da dinamina (FAELBER *et al.*, 2012).

Essa interação, que envolve a hélice um ($\alpha 1$) da região de haste e a hélice 1 do domínio PH, é denominada de interface quatro (FAELBER *et al.*, 2012). Mutações dessa interface em qualquer um desses dois domínios levam a um aumento na taxa de oligomerização da dinamina quando se encontra em solução (KENNISTON; LEMMON, 2012; FAELBER *et al.*, 2011). Segundo Gao e colaboradores (2010), o Loop 4 de MxA, o qual corresponde ao domínio PH da dinamina, também está envolvido no processo de oligomerização. Essa interface quatro, então, atuaria como uma interação inibitória da oligomerização.

1.4 MODELOS DE CISÃO DE MEMBRANAS

Vários modelos têm sido propostos para explicar como os oligômeros de dinamina medeiam a remodelação de membranas, acoplando com a hidrólise de GTP. Reconstruções por microscopia eletrônica indicam que a ligação ao nucleotídeo induz a constrição do oligômero de dinamina, quando esse estiver ancorado em uma membrana deformável (HINSHAW; SCHMID, 1995; CHEN *et al.*, 2004). Deste modo, 15 dímeros foram encontrados por volta na hélice de dinamina no seu estado livre de nucleotídeo. Enquanto que, apenas 13 dímeros foram encontrados na presença de um análogo não hidrolisável de GTP (MEARS *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem que, na ausência de nucleotídeo, a dinamina se monta ou oligomeriza em uma conformação relaxada em

volta do pescoço formado na membrana alvo. Então, mudanças conformacionais dependentes de nucleotídeo induzem a constrição do oligômero, seguido pela cisão da membrana (modelo de constrição, torniquete ou *constrictase*).

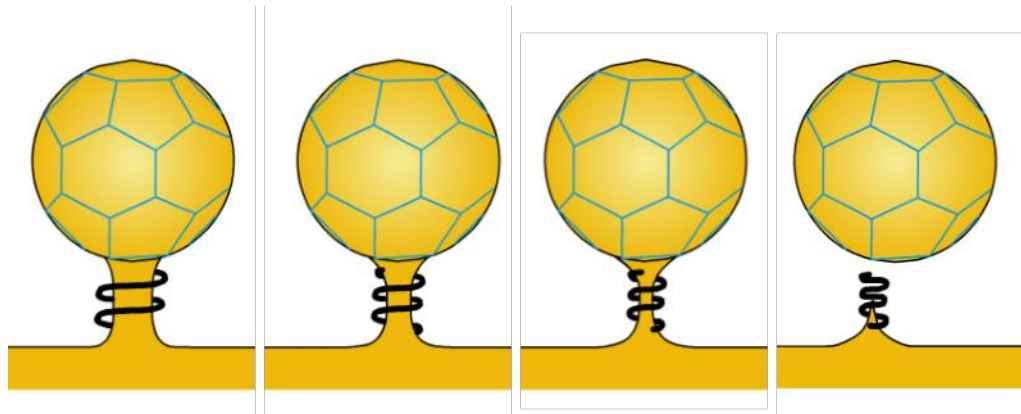


FIGURA 10 - MODELO DE ATUAÇÃO DA DINAMINA NA FORMAÇÃO DE VESÍCULAS – “TORNIQUETE”.
FONTE: modificado do site <http://www.endocytosis.org/>

Foi observado por Stowell e colaboradores (1999) que, na presença de túbulos rígidos de membrana, a hélice de dinamina está intimamente empacotada ao longo do eixo da hélice quando se está ligada ao GTP e está na forma mais aberta quando na presença de GDP. Deste modo, um outro modelo é sugerido onde a hélice formada por oligômeros de dinamina atuaria como uma mola que se expande na hidrólise de GTP, catalisando, então, a cisão da membrana (modelo mola ou *poppase*).

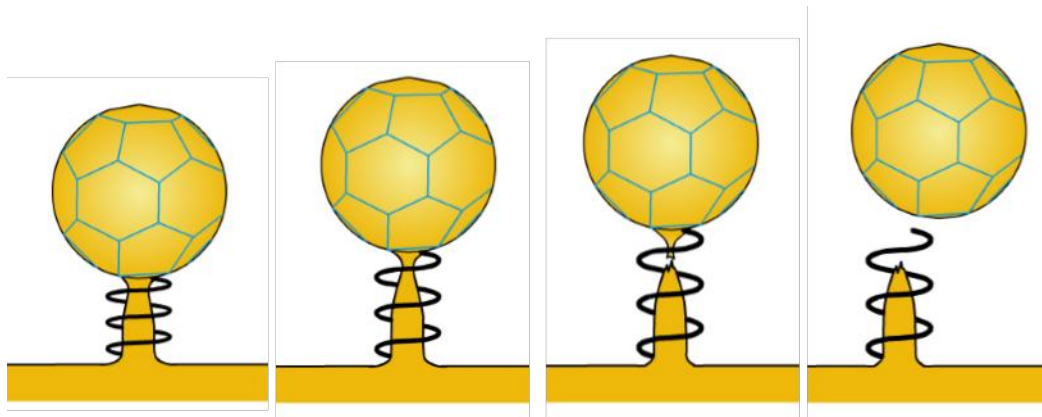


FIGURA 11 - MODELO DE ATUAÇÃO DA DINAMINA NA FORMAÇÃO DE VESÍCULAS – “MOLA”.
FONTE: modificado do site <http://www.endocytosis.org/>

Ensaios de monitoramento *in vivo* da remodelação de membranas mediada por dinamina mostraram que a hidrólise de GTP leva a uma torção dos túbulos (pescoço ou gargalo) de membrana, indicando que essa torção mediada por dinamina levaria à cisão da vesícula (modelo de torção ou *twistase*) (ROUX *et al.*, 2006).

Faelber e colaboradores (2011) sugerem um modelo estrutural para as mudanças conformacionais na hélice de dinamina durante a cisão de membranas. Esse modelo unifica todos os três modelos citados anteriormente. Na presença de GTP, em concentrações celulares maiores que 100 mM e considerando a baixa afinidade da dinamina por esse nucleotídeo, é previsto que a dinamina esteja na forma ligada ao GTP, quando, então, é recrutada para o pescoço da vesícula em formação. As interações inibitórias entre a região de haste com o domínio PH (interface quatro) e com o BSE (interface cinco) são desfeitas pela ligação a membranas e/ou pela oligomerização e, em seguida, subunidades de dinaminas são recrutadas. Quando o oligômero de dinamina completa uma única volta em torno do pescoço da vesícula, os domínios G das extremidades dos filamentos opostos se dimerizam e fecham a primeira volta da hélice. Assume-se que a dimerização do domínio G na presença de GTP abre a interface seis, que é fruto da interação do domínio G com o BSE. Ainda não se sabe quantas moléculas de dinamina ainda podem ser recrutadas antes que a hidrólise de GTP seja acionada, porém, sabe-se que o intervalo de tempo para essa montagem é limitado, visto que o K_{max} da atividade GTPásica da dinamina é de $4s^{-1}$ (FAELBER *et al.*, 2011).

A dimerização do domínio G induz a hidrólise de GTP, seguido por movimentos conformacionais do BSE contra o domínio G. Esse movimento deve agir como uma retroalimentação, arrastando os filamentos vizinhos ao longo um dos outros (CHAPPIE *et al.*, 2011; FORD *et al.*, 2011). De uma maneira alternativa, a dimerização do domínio G induz a compactação da hélice de dinamina. Consegue-se, por esse meio, compensar parcial ou totalmente a energia necessária para promover uma maior curvatura na membrana na qual está inserida. Isto pode levar a um deslizamento passivo dos filamentos vizinhos para adaptar a hélice ao diâmetro da membrana molde (FAELBER *et al.*, 2011). Ambos os cenários levam a uma constrição do pescoço da vesícula em brotamento, onde os oligômeros de dinamina atuam de maneira similar a um torniquete.

Durante a constrição, a hélice de dinamina deve sofrer uma torção de seus

filamentos. Essa torção foi de fato observada por microscopia de luz (ROUX *et al.*, 2006). Múltiplos ciclos de ligação e hidrólise de GTP devem levar a sucessiva compactação ou aperto da hélice de dinamina e do pescoço da vesícula. Como resultado, tem-se um aumento da curvatura na membrana que irá desestabilizar a membrana do pescoço. O próprio revestimento de dinamina atua como uma armação ou esqueleto que impede a clivagem da membrana pela constrição por si só (BOUCROT *et al.*, 2012). Então, Faelber e colaboradores (2011) sugerem que a hidrólise de GTP, seguido pela dissociação dos domínios G, de acordo com o modelo “mola”, deve separar os filamentos de dinamina da hélice, permitindo que a membrana altamente curvada do pescoço da vesícula se arrebente.

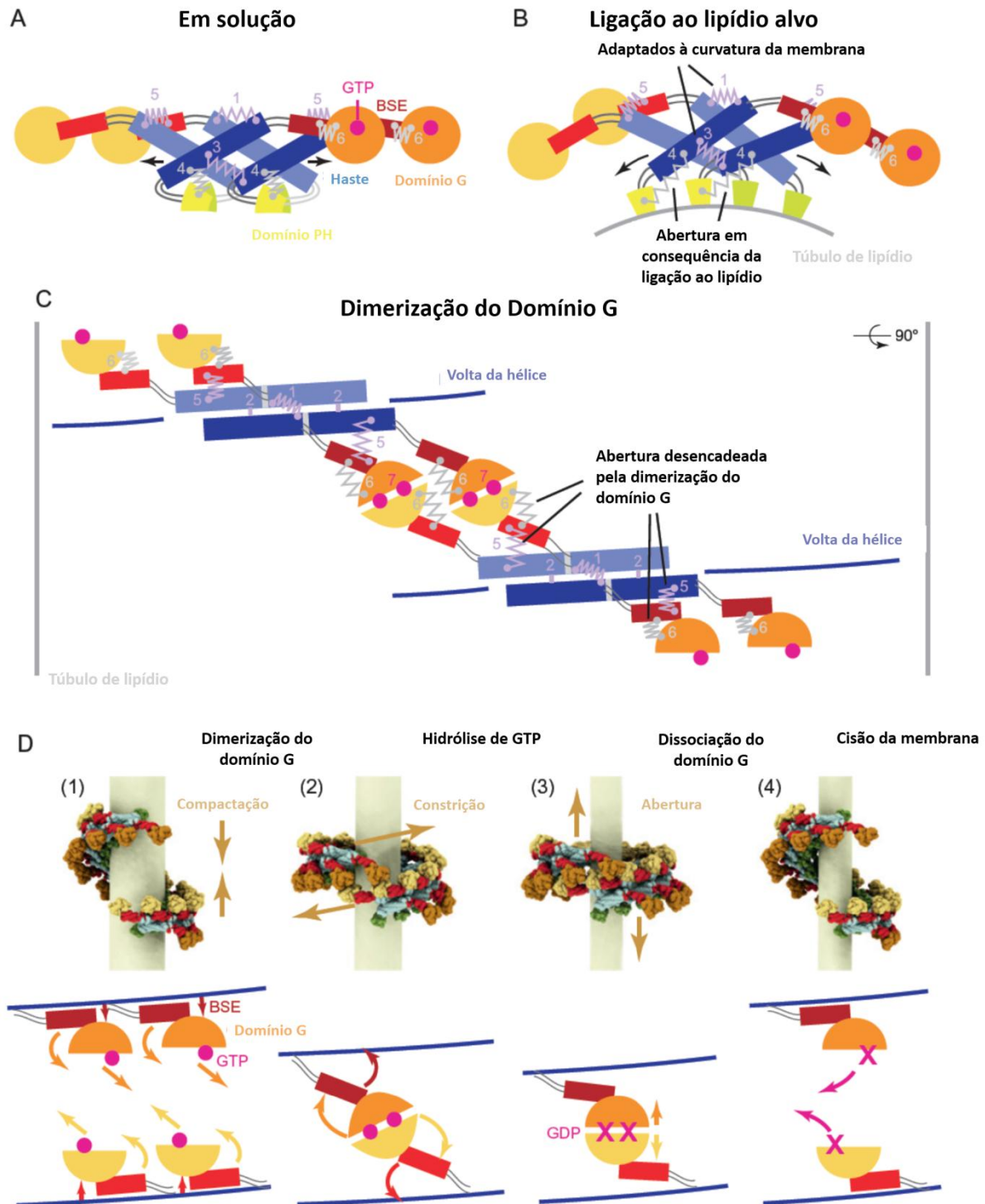


FIGURA 12 – MODELO DE CISÃO DE MEMBRANAS PELA DINAMINA BASEADO EM DADOS CRISTALOGRAFICOS. (A) Em solução, a dinamina é predominantemente tetramérica. As interações da interfaces estão representadas pelas “molas” (em cinza, as interações intramolecular e em roxo, as interações intermolecular). (B) Durante a ligação a membranas, as interfaces 1 e 3 podem se adaptar ao diâmetro do túbulo ou pescoço lipídico. Essa interação com a membrana desfaz a interação autoinibitória entre o domínio PH e a região de haste (ocorre a abertura da interface quatro). (C) Quando os domínios G dos filamentos vizinhos se dimerizam, o BSE é afastado da região de haste (abertura da interface cinco) e

do domínio G (interface seis). (D) Modelo do mecanismo de ação da dinamina na cisão de membranas. 1 – Quando o filamento de dinamina em crescimento “abraçar” a membrana alvo, os domínios G (no estado ligado a GTP) dos filamentos vizinhos se opõem. 2 – Esses domínios G, então, se dimerizam, levando à compactação da hélice de dinamina. 3 – A hidrólise de GTP leva a alterações conformacionais do BSE que se choca contra o domínio G. Esse movimento age como uma retroalimentação arrastando os filamentos vizinhos ao longo um dos outros ou induz uma grande curvatura na membrana subjacente, levando a um deslizamento passivo dos filamentos. (D) Os domínios G, agora ligados ao GDP, separam-se e levam à dissociação dos filamentos vizinhos. Isso deve permitir que o pescoço de membrana, formado altamente tensionado se rompa.

FONTE: modificado de Faelber *et al.* (2012)

1.5 O *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

Em 15 de abril de 1909, Carlos Chagas (1878-1934), pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, nome dado em homenagem ao seu mestre Oswaldo Cruz. Identificou ainda o inseto que o transmitia, o triatomíneo conhecido popularmente como “barbeiro” (CHAGAS, 1909; KROPF, 2013). Apesar dos esforços de mais de um século desde sua descoberta, a doença de Chagas ou tripanosomíase americana continua sendo um grande problema de saúde que acomete cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina, com número de mortes de cerca de quatorze mil por ano. Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2010, foram registrados no Brasil 945 casos de doença de Chagas aguda. Estima-se que existam no Brasil em torno de 2 milhões de indivíduos infectados (SVS/MS, 2010).

Sem vacinas ou tratamento quimioterápico eficiente, a principal estratégia de controle limita-se à prevenção da transmissão por transfusão sanguínea e ao controle populacional do vetor. Além da sua importância como patógeno humano, este organismo apresenta características peculiares às quais o tornam um excelente modelo para o estudo de questões biológicas básicas.

Trypanosoma cruzi pertence à ordem Kinetoplastida, que compreende as famílias Bodonidae e Trypanosomatidae. Nestas famílias encontramos flagelados com um ou dois flagelos que se originam de uma abertura, conhecida como bolsa flagelar. Normalmente contém uma estrutura paraflagelar e uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário. A família Trypanosomatidae inclui os seguintes gêneros importantes: *Blastocrithidia*, *Crithidia*,

Endotrypanum, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas* e *Trypanosoma* (DE SOUZA, 2013).

O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas importantes como o *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas; *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*, agentes da doença do sono; e de animais o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum* (DE SOUZA, 2013).

Trypanosoma cruzi apresenta um ciclo complexo na natureza, envolvendo pelo menos quatro estágios distintos de desenvolvimento e dois hospedeiros filogeneticamente distantes, inseto e mamífero. As formas replicativas epimastigotas e amastigotas dos hospedeiros invertebrado e mamífero, respectivamente, alternam-se com as formas infectivas e não-proliferativas tripomastigotas metacíclicas (proveniente do inseto vetor) e tripomastigotas sanguíneas (originária do mamífero infectado) (DE SOUZA, 1984).

O ciclo de vida do *T. cruzi*, descrito a seguir, pode ser acompanhado pela FIGURA 13. A infecção do barbeiro (1) ocorre quando este pica um mamífero infectado e ingere formas tripomastigotas sanguíneas (2). Na porção anterior do estômago os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (3). Quando estas formas epimastigotas alcançam o intestino, começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária (4) e aderem-se às membranas perimicrovilares. Posteriormente, os epimastigotas se soltam e movem-se para o intestino posterior, onde iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (5) que aderem à cutícula que reveste o epitélio do reto e do saco retal do inseto. Ao se soltarem do epitélio, podem ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sanguíneo. A infecção de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado pica o mamífero. Neste processo, o inseto geralmente defeca e urina (6), depositando, assim, sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectiva (7), porém não replicativa. A invasão do parasito ocorre quando o hospedeiro se coça, o que gera lesões da pele por onde o parasita pode penetrar ou quando ele entra em contato com a mucosa. Os tripomastigotas metacíclicos acessam a circulação sanguínea, aderindo e invadindo uma

gama de células nucleadas como, por exemplo, macrófagos (8), células musculares e epiteliais. Inicialmente, a forma tripomastigota é fagocitada pelo macrófago, seguindo-se a formação do vacúolo parasitóforo (9). No interior do vacúolo parasitóforo, a forma tripomastigota se diferencia para a forma amastigota e ocorre a lise da membrana do vacúolo parasitóforo (10). No citoplasma, esta forma se multiplica por fissões binárias sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma (11). Após as sucessivas divisões, os amastigotas iniciam sua diferenciação para a forma tripomastigota (12) antes de a célula hospedeira ser rompida pelo excesso de parasitas (13). A lise da célula hospedeira pode ocorrer antes da total diferenciação de amastigotas para tripomastigotas, o que gera o aparecimento de diferentes formas no meio externo (14). No meio extracelular, os tripomastigotas (15a) e amastigotas (15b) podem infectar novas células que ali estejam presentes (Atlas Didático – O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*).

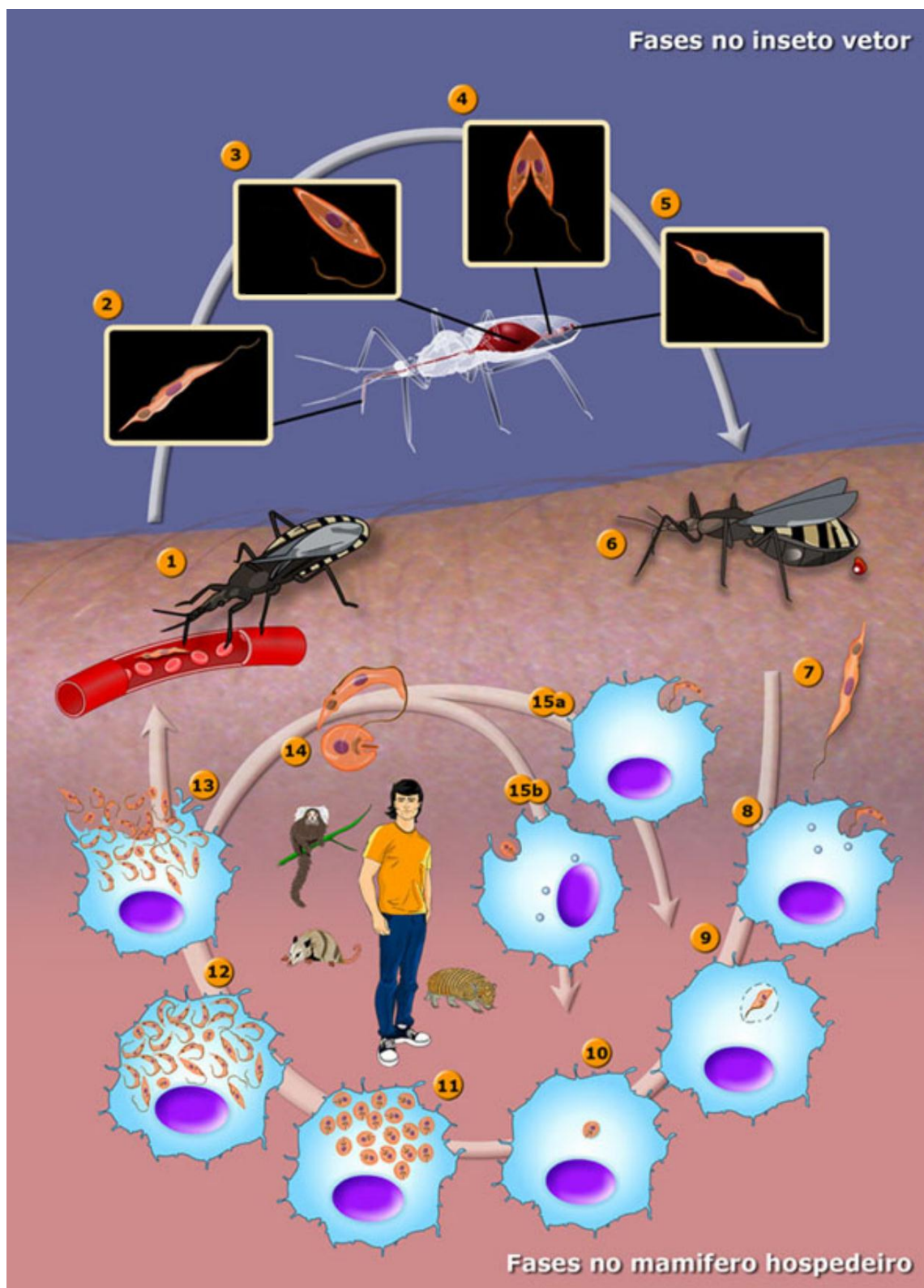


FIGURA 13 - CICLO BIOLÓGICO DO *T. cruzi* NO INTERIOR DO INSETO VETOR E DO MAMÍFERO HOSPEDEIRO.

FONTE: Atlas Didático - O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*
(<http://labspace.open.ac.uk/mod/resource/view.php?id=459540>)

O parasita pode ainda penetrar no corpo humano por outras vias: por transfusão sanguínea e transplante de órgãos (atualmente quase eliminados no Brasil), durante a gravidez e até mesmo pela ingestão do inseto infectado acidentalmente triturado junto a alimentos (contaminação por via oral) como o caldo de cana de açúcar, sucos de açaí e goiaba (YOSHIDA, 2008).

1.6 ENDOCITOSE EM TRIPANOSOMATÍDEOS

A endocitose é essencial para a sobrevivência de células eucarióticas e tem sido bem caracterizada em células de mamíferos e leveduras. Entre alguns parasitas pertencentes a ordem Kinetoplastida, além de ser um sistema de captação de material extracelular, para atender às suas necessidades nutricionais e apoiar a intensa proliferação característica de algumas fases do ciclo de vida, também tem um papel ativo e fundamental na virulência e evasão do sistema imune do hospedeiro (Morgan et al., 2002).

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados que apresentam algumas particularidades na sua arquitetura celular quando comparados com as demais células eucarióticas e essas particularidades refletem nas vias de captação de nutrientes por esses organismos. Uma delas é o fato de a membrana plasmática estar disposta sobre um arcabouço de microtúbulos estabilizados por ligações cruzadas e associados com a própria membrana plasmática (LANDFEAR; IGNATUSCHENKO, 2001; MORGAN *et al.*, 2002). A associação do citoesqueleto com a membrana plasmática já é bem caracterizada na maioria das células eucarióticas. No entanto, essa associação é particularmente forte nos tripanosomatídeos, sendo que, mesmo após a lise do parasita essa associação permanece (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Devido à presença deste arcabouço, invaginações de membrana são dificultadas na maior parte da superfície do protozoário. No entanto, este arranjo de microtúbulos é descontinuado na porção anterior da célula, onde há uma grande invaginação da membrana plasmática. Essa região é denominada de bolsa flagelar e é de onde o flagelo emerge da célula. Em tripanosomatídeos todas as modalidades da endocitose, bem como a exocitose, ocorrem exclusivamente neste local, com exceção dos protozoários

que apresentam citóstoma e citofaringe (SOARES; DE SOUZA, 1991; WEBSTER; RUSSEL, 1993; OVERATH *et al.*, 1997; DE SOUZA, 2002; MORGAN *et al.*, 2002).

Algumas espécies de *Trypanosoma* internalizam toda a área de membrana da bolsa flagelar a cada dois minutos, fazendo desta região (ou organela) um local com a maior atividade endocítica conhecida entre as células eucarióticas (COPPENS *et al.*, 1987; OVERATH *et al.*, 1997). O citoplasma compreendido entre o núcleo e a bolsa flagelar concentra o complexo de Golgi e uma complexa rede de túbulos e vesículas, além de outras estruturas associadas à bolsa flagelar e relacionadas à osmo-regulação. A curta distância entre esta rede de túbulos e vesículas e a bolsa flagelar permite que vesículas trafeguem rapidamente entre os compartimentos celulares, aumentando a eficiência do transporte (BRICKMAN *et al.*, 1995; FIELD *et al.*, 1998, 2004; GRUNFELDER *et al.*, 2003).

1.6.1 Endocitose em *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi, ao contrário dos tripanosomatídeos africanos, apresenta uma estrutura típica diretamente envolvida na captação de macromoléculas (além da bolsa flagelar) - o citóstoma/citofaringe. Esta estrutura é uma invaginação especializada na membrana plasmática que penetra profundamente no citoplasma, terminando na porção posterior da célula após o núcleo. A invaginação (citofaringe) apresenta sua abertura para o meio externo (citóstoma) localizada lateralmente ao corpo da célula, próximo à região da bolsa flagelar (MILDER; DEANE, 1969; DE SOUZA *et al.*, 1978; DE SOUZA, 2002). O citóstoma está presente apenas em formas epimastigotas e amastigotas, sendo uma região de grande interesse, uma vez que a maior parte da atividade endocítica no *T. cruzi* ocorre a partir desta estrutura, em vez de ocorrer via bolsa flagelar (PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000; VATARUNAKAMURA *et al.*, 2005). Assim, o *T. cruzi* se apresenta como uma célula polarizada, com duas estruturas relacionadas à endocitose e exocitose: o citóstoma/citofaringe e a bolsa flagelar.

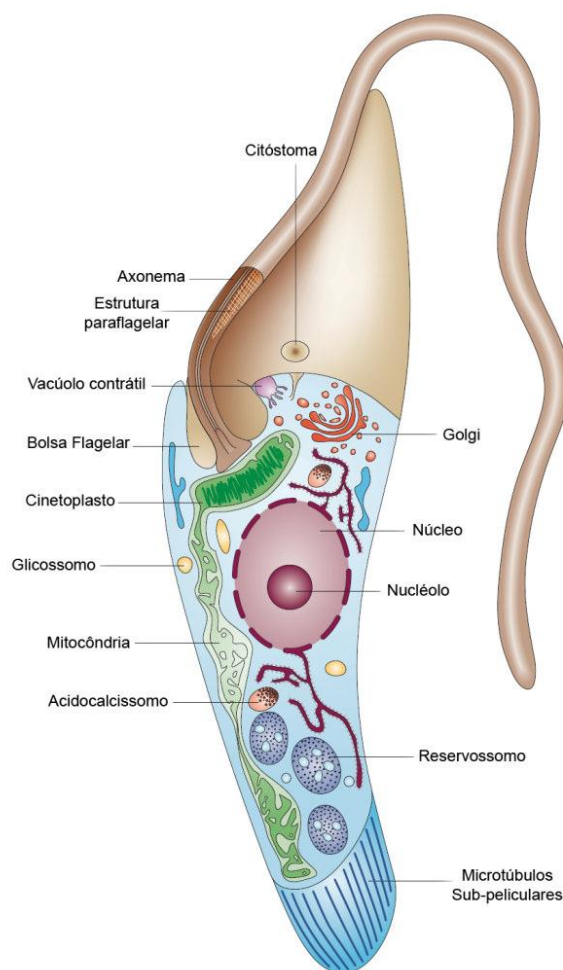


FIGURA 14 – ESQUEMA DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS CELULARES DE *T. cruzi*.
FONTE: Do Campo *et al.* (2005).

Em *T. cruzi*, a evidência da endocitose mediada por receptor foi relatada em formas epimastigotas (SOARES; DE SOUZA, 1991; PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000). Análises ultra-estruturais da endocitose de albumina conjugada a ouro coloidal permitiram identificar o brotamento de vesículas a partir da bolsa flagelar e do complexo de Golgi, contendo o típico revestimento externo que em outros modelos celulares têm sido descrito como clatrina (SANT'ANNA *et al.*, 2004; CORRÊA *et al.*, 2007). Já foi demonstrada em formas epimastigotas de *T. cruzi* a ligação e captação de transferrina e LDL conjugados a ouro coloidal, tanto através da bolsa flagelar, quanto através do citóstoma. No entanto, não foi observado nenhum tipo de revestimento nas superfícies das vesículas que brotam do citóstoma. Estabeleceu-se então que a endocitose em *T. cruzi* ocorre através de vesículas endocíticas, com ou sem revestimento, que brotam a

partir de dois distintos sítios que apresentam como destino final a fusão com o compartimento do reservosomo (SOARES *et al.*, 1992; DE FIGUEIREDO; SOARES, 2000; PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000; CORRÊA *et al.*, 2007). Os reservossomos são organelas da via endocítica, encontradas na forma epimastigota de *T. cruzi*. São comumente esféricas com diâmetro médio de 700 nm, delimitada por uma unidade de membrana e possuindo conteúdo elétron-denso e inclusões elétron-lucentes. Os reservossomos são o destino final de todas as macromoléculas capturadas no meio extracelular, ingeridas pelo processo endocítico do parasita (DE SOUZA *et al.*, 2009).

Corrêa e colaboradores (2007) identificaram em base de dados genômicos do *T. cruzi* a presença do conjunto completo de genes necessários à expressão das proteínas que atuam no brotamento de vesículas revestidas por clatrina nesses parasitas (cadeia pesada de clatrina, adaptinas e dinamina). Além dos dados computacionais, a expressão da clatrina em *T. cruzi* foi demonstrada por *Western blot* utilizando anticorpos policlonais feitos para a cadeia pesada de clatrina bovina. A proteína foi localizada por imunofluorescência na região do complexo de Golgi e da bolsa flagelar. Curiosamente, agentes que perturbam a endocitose mediada por receptor não alteram a endocitose de transferrina em formas epimastigotas (CORRÊA *et al.*, 2008). Ao contrário de *T. brucei*, *T. cruzi* possui os genes do complexo adaptador AP2 em seu genoma (ALLEN *et al.*, 2003; DENNY *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2007), indicando que este parasita parece ter atividade endocítica mediada por vesículas revestidas por clatrina.

Em resumo, há um peculiar sistema de endocitose em *T. cruzi* envolvendo pelo menos dois diferentes mecanismos separados fisicamente em dois domínios da membrana. A endocitose mediada por clatrina estaria restrita à bolsa flagelar, enquanto que a endocitose independente de clatrina ocorreria, majoritariamente, pelo citóstoma. Um estudo ultra-estrutural em formas epimastigotas de *T. cruzi* indicou a presença de vesículas com revestimento análogo ao de clatrina na região da bolsa flagelar (CORRÊA *et al.*, 2007).

Embora a endocitose em *T. cruzi* venha sendo estudada há bastante tempo, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares atuantes nesse processo nos diferentes domínios de membrana desse protozoário.

1.7 A DINAMINA E O *Trypanosoma cruzi*

Como já visto nos tópicos anteriores, a dinamina é uma proteína que participa de diversos eventos celulares. Em mamíferos verifica-se a presença de diversas isoformas da proteína. No caso dos tripanosomatídeos, há evidências de que se tenha uma única proteína. A função mais estudada da dinamina é sua participação no processo endocítico. No entanto, pouco se sabe sobre o papel dessa interessante proteína no tráfego de membranas do *T. cruzi*.

Acredita-se que nos tripanosomatídeos ocorram apenas três tipos de endocitose: endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina e endocitose independente de clatrina e de caveolina (pinocitose de fase fluida). Pelo fato da existência da rede de microtúbulos subpelicular sob a membrana plasmática desses organismos, não há favorecimento de duas vias endocíticas: a fagocitose e a macropinocitose (SOARES, 2006).

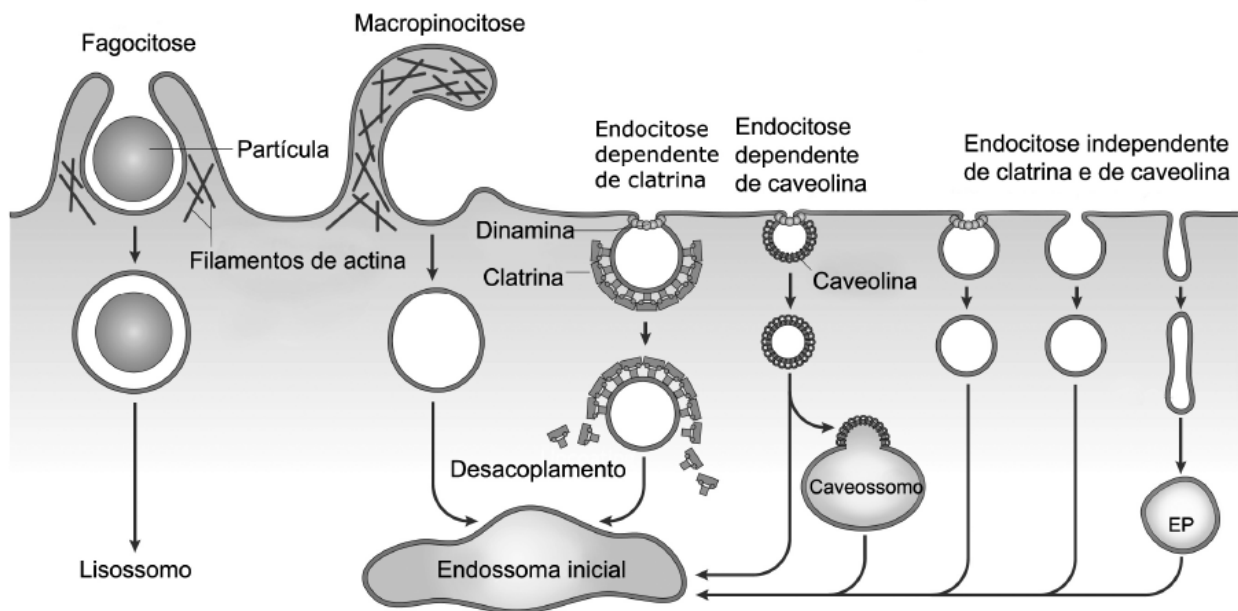


FIGURA 15 - VIAS DE ENDOCITOSE. Partículas maiores podem ser englobadas por fagocitose, enquanto que a macropinocitose tem papel na captação de fluídos. Outras moléculas, como por exemplo receptores, podem ser internalizadas via diferentes tipos de vesículas endocíticas. As vesículas endocíticas podem ser classificadas de acordo com a presença/ausência de componente protéico em seu revestimento, como endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina ou endocitose independente de clatrina e caveolina. EP (ou GEEC) - endossomo inicial rico em proteínas ancoradas à membrana via GPI. FONTE: Modificado de Mayor e Pagano, 2007.

A pinocitose de fase fluida é independente de dinamina e foi identificada pela primeira vez em células HeLa, onde a expressão de um mutante da dinamina um bloqueou a endocitose mediada por receptor, mas aumentou a captação de moléculas via endocitose de fase fluida (DAMKE *et al.*, 1995). Nesse tipo de endocitose parece que estão envolvidas pequenas GTPases, CDC42 (membro na família Rho) e/ou ARF6 (membro da família Arf) (MAYOR; PAGANO, 2007).

Além do fato de não saber o papel da dinamina no processo endocítico do *T. cruzi* e pela evidência de que esse organismo tenha somente uma única dinamina, estudos para avaliar a participação dessa única proteína nos diversos eventos celulares já caracterizados em outros organismos seriam de fundamental interesse. Como já citado anteriormente, diversos estudos mostram a participação de DLPs na divisão mitocondrial. Em tripanosomatídeos essa organela tem uma característica peculiar, sendo uma organela única que ocupa quase toda extensão do parasita, com ramificações e seu DNA possui características interessantes, sendo chamada nesses organismos de cinetoplasto, deixando esse modelo ainda mais interessante.

Uma DLP já foi caracterizada em *Trypanosoma brucei* (TbDLP) (MORGAN *et al.*, 2004; CHANEZ *et al.*, 2006). A função dessa proteína foi analisada através da técnica de RNAi nas formas procíclicas e sanguíneas. Nas formas sanguíneas parece que TbDLP participa da fissão mitocondrial, mas não na endocitose (MORGAN *et al.*, 2004). No entanto, foi mostrado que nas formas procíclicas, essa proteína parece atuar na fissão mitocondrial, na endocitose e também na citocinese (CHANEZ *et al.*, 2006).

Segundo uma revisão recentemente publicada, existe uma grande evidência de que proteínas que estão envolvidas na endocitose, tais como clatrina e dinamina, entre outras, também possuem um papel na mitose. Essas proteínas foram encontradas associadas com o centrôssomo ou o fuso mitótico, que são estruturas envolvidas na mitose (SCITA; DI FIORI, 2010). Esse assunto é bastante controverso, mas para esses autores a endocitose teria um papel importante na regulação da citocinese. O tráfego de membranas seria de fundamental importância durante a mitose, onde ocorre mudança da forma e do tamanho da célula e também facilitaria o fechamento rápido do espaço intracelular formado durante a citocinese.

Dinamina e proteínas semelhantes à dinamina têm demonstrado ter papéis essenciais na divisão celular de plantas (KANG *et al*, 2003), animais (SKOP *et al*, 2004; THOMPSON *et al*, 2002) e no protista *Dictyostelium discoideum* (WIENKE *et al*, 1999). Deste modo, será que a dinamina presente no *T. cruzi* tem algum papel na sua orquestrada divisão?

O número de proteínas que sabidamente interagem com as dinaminas vem crescendo nos últimos dias, bem como outras funções da dinamina e das proteínas semelhantes à dinamina estão sendo elucidadas. Esse número crescerá ainda mais, tanto mais for conhecido o papel das dinaminas nos mais diversos processos celulares.

A dinamina, por ser uma proteína multifuncional com características extremamente interessantes, torna-se oportuna sua caracterização no organismo *Trypanosoma cruzi*. A rede regulatória do papel da dinamina em cada um desses eventos celulares no *T. cruzi* ainda não foi determinada. Ainda há muito que aprender sobre os mecanismos de endocitose, divisão mitocondrial e divisão celular desse organismo. Portanto, elucidar a participação da dinamina em tais processos é o objetivo central desse trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar a função da TcDLP, membro da superfamília das dinaminas, no *Trypanosoma cruzi*, evidenciando os processos celulares em que possa estar envolvida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar *in silico* a TcDLP.
- b) Analisar a localização subcelular da TcDLP através de ensaios de imunofluorescência;
- c) Analisar a expressão de TcDLP durante o ciclo de vida do parasita;
- d) Analisar as características biofísicas e bioquímicas da TcDLP através dos ensaios de:
 - Atividade GTPásica;
 - Cosedimentação de lipossomos;
 - Tubulação de lipossomos.
- e) Caracterizar o papel celular da TcDLP em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizando ensaios *in vivo* através das técnicas de:
 - Nocaute gênico;
 - Efeito dominante negativo;
 - Ensaio de endocitose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDÊNCIA DOS MATERIAIS E REAGENTES

Amersham-Pharmacia Biotech: dNTPs; inibidores de proteases.

Amershan Bioscience: membranas Hybond de nitrocelulose e de nylon, filmes de raio-X Hyperfilm®, endonucleases de restrição, resina de glutationa sefarose.

BioRad: acrilamida, agarose; azul de bromofenol; bis-acrilamida, persulfato de amônia, xilenocianol.

Clontech Laboratories: Talon®

Cult-lab: soro fetal bovino.

Difco: extrato de levedura; infuso de fígado; triptose.

Invitrogen: IgG de camundongo ou coelho conjugados ao fluoróforo Alexa 488; corante Hoechst 33342 para marcação de DNA ; transferrina conjugada ao fluoróforo AlexaFluor 633; ProLong Gold Antifade; agarose, X-gal, marcador de massa molecular de proteínas Benchmark, BP Clonase™ enzyme mix; EDTA; DTT; fenol; IPTG, kit Nick Translation, LR Clonase™ enzyme mix; Platinum® Pfx DNA Polimerase; Platinum® Taq; DNA Polimerase; Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity; Taq DNA polimerase.

Merck: acetato de sódio; ácido acético glacial; ácido bórico; ácido clorídrico; álcool isoamílico; citrato de sódio; cloreto de amônia; cloreto de cálcio; cloreto de lítio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; etanol absoluto; formaldeído, fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; glicose; glicina, hidróxido de sódio; isopropanol, maltose; SDS; sulfato de amônia; sulfato de magnésio.

Merck Millipore: KOD hot start DNA polymerase, benzonase®, kit vetor pET-46 Ek/LIC.

Microbiológica: hemina.

Millipore: filtro 0,22 µm.

New England Biolabs: endonucleases de restrição, 1kb Plus DNA ladder.

Promega: fosfatase alcalina; NBT; BCIP.

Qiagen: QIAprep Spin Miniprep; QIAprep Spin Midiprep; coluna de Ni-NTA (nitrilo-triacetic acid – QIAexpress System), QIAquick gel extraction kit.

Serva Electrophoresis: Alu-gel S.

Sigma-Aldrich: membranas de diálise.

Sigma: ácido L-aspártico; ácido L-glutâmico; adjuvante completo de Freund, ampicilina; carbenicilina; β -mercaptoetanol; brometo de etídeo; BSA; cicloheximida; cloranfenicol; DMSO; E-64; ficoll; glicerol, heparina; hepes; imidazol; IPTG; kanamicina; L-prolina; n-propil-galato; paraformaldeído; PMSF; poli-Llisina; Ponceau-S; triton X-100; tween 20.

Syntec: cetamina.

TPP: garrafas para cultivo de células.

Vetec: glicina.

3.2 SOLUÇÕES

Fenol/clorofórmio: fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 10 partes.

H₂O: a água utilizada em todos os procedimentos foi proveniente do sistema de filtragem Elga.

PBS: KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄.7H₂O 4,3 mM e NaCl 137 mM.

Solução de bloqueio para *Western blotting*: PBS, 0,1% tween 20, 5% leite em pó desnatado.

Solução de brometo de etídeo: solução 5 μ g/mL de brometo de etídeo em água destilada.

Solução de hibridação para *Southern blotting*: SSC 6X, solução de Denhardt 5X, 0,1% SDS, 100 μ g/mL DNA fita simples de espermatozoides de salmão.

Solução de Ponceau S: 0,5% Ponceau S (Sigma P-3504), 1% ácido acético glacial.

Solução de fixação de géis de proteínas SDS-PAGE: 50% etanol, 10% ácido acético.

Solução de para coloração de géis de proteínas SDS-PAGE: 0,1% azul de Coomassie G-250 em etanol/ácido acético v/v (50%:10%), água q.s.p.

Solução de descoloração de géis de proteínas SDS-PAGE: 10% ácido acético.

Solução tampão GTPase: Hepes 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, KCl 5mM e MgCl₂ 5mM

Solução PBS-tween 20 0,1%: PBS contendo 0,1% de Tween 20.

Solução TE (Tris-EDTA): Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM.

Solução de sonicação: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, inibidor de protease.

Solução de suspensão de corpúsculo: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M e Triton X-100 2%.

Solução de bloqueio para imunofluorescência: PBS e BSA 1,5% (albumina sérica bovina).

Solução corante para citometria de fluxo: Tris-HCl 3,4 mM, iodeto de propídeo 75 µM, NP40 0,1%, NaCl 10 mM e Rnase A 700 U/L):

Solução de lise para Toothpick: NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5mM e azul de bromofenol 0,025 %.

Tampão de amostra de proteínas: Tris-HCl 40 mM pH 6,8, 1% SDS, 2,5% β-mercaptoetanol, 6% glicerol, 0,005% azul de bromofenol.

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE: Tris-HCl 25 mM pH 8,4, glicina 192 mM pH 8,4, 0,1% SDS.

Tampão de eletroporação de *T. cruzi*: NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM pH 7,5.

Tampão de revelação para fosfatase alcalina: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂.

Tampão de transferência para *Western Blotting*: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%.

Tampão SSC 20x: citrato de sódio 0,3M pH 7, NaCl 0, 3M.

Tampão TBE para eletroforese de DNA (Tris-ácido bórico-EDTA): Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0.

Tampão TELT: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M, Triton X-100 4%.

TF (tampão de amostra para DNA – Ficoll 10x): Ficoll 25%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% em tampão TBE 1x.

3.3 MEIOS DE CULTURA

Meio LB (Luria-Bertani): bacto-triptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, extrato de levedura 5 g/L.

Meio TB (Terrific Broth): bacto-triptona 12 g/L, extrato de levedura 24 g/L.

Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*): extrato de levedura 15 g/L; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/L; glicose 2,2 g/L; hemina 0,02 g/L; infuso de fígado 5 g/L; KCl 0,4 g/L; NaCl 4,4 g/L; soro fetal bovino 10% (v/v) e triptose 5 g/L. pH 7,2 ajustado com HCl.

Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*): CaCl₂ 2 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2 mM; 190 mM NaCl; tampão fosfato 8 mM, pH 6,0.

Meio TAU3AAG: meio TAU suplementado com ácido L-aspartico 2 mM, ácido L-glutâmico 50 mM, L-prolina 10 mM e glicose 10 mM.

3.4 CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho, foram utilizadas as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do clone Dm28c de *Trypanosoma cruzi* (CONTRERAS et al., 1985, CONTRERAS et al., 1988).

3.4.1 Formas epimastigotas

As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT + 10% soro bovino fetal (SBF) com passagens a cada 3 dias (fase logarítmica de crescimento), a partir de inóculo contendo 10⁶ células/mL.

3.4.2 Tripomastigotas metacíclicos

As formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (BONALDO et al., 1988). Formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (densidade celular entre 5 – 7 x 10⁷ células/mL) foram coletadas por centrifugação a 7000 x g, por 5 min, a 10 °C, e ressuspensas em meio TAU, na concentração de 5 x 10⁸ células/mL e mantidas a 28 °C por 2 h. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células foram transferidas para garrafas de 300 cm² contendo 200 mL de meio TAU3AAG (concentração final de 5 x 10⁶ células/mL). Uma proporção dos parasitas que se aderiram à superfície da garrafa de cultivo se diferenciou em metacíclicos, os quais foram liberados no sobrenadante (BONALDO et

al., 1988). Este procedimento foi realizado para verificação da capacidade de diferenciação da população de parasitas contendo um alelo do gene de dinamina (dlp, *dinamina like protein*) deletado por nocaute gênico (*T. cruzi*^{dlp/Δdlp::neo}), onde o número de metacíclicos no sobrenadante foi contado após 96 h de incubação em meio TAU3AAG.

3.5 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS E MANIPULAÇÃO DO DNA

Para se ter um panorama geral, os plasmídeos e oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados neste trabalho estão listados no quadro 1.

Nome	Sequência (5' – 3')
5NEOF	ACAAGTCGACCGCCCAAGCGAAAATAAAATAA
5NEOR	ACAAGTCGACCGCTTAGCAGCCGTCCTA
3NEOF	ACGAATTCATGGAGAATCAAGCATTGCCA
3NEOR	ACGAATTCTCCTCCTGTTTCATTAGACCG
5HYGF	ACAAGTCGACCGCCCAAACGAAAATAAAATAA
5HYGR	ACAAGTCGACCGCTTAGCAGCCGTCCTA
3HYGF	ACGAATTCATGGAGAAGCAAGCATTGCC
3HYGR	ACGAATTCAATATGAAAGGTCGTTCTTTTC
114F	CCGGTACCATGAATCAGCTTATCGCTGTT
115R	AATTGTCGACGCCACCGTGCGGATGC
111F	CGCGGATCCGAGCTCAAGCTGGATAACTTTCTAGG
112R	TGCTCTAGATAATGTAAATTCACGCACACTC
1F	TGTCCCGGAATGAATCAGCTTATCGCTGT
2R	AAGAAAAATAGCGGCCGCTTATAATGTAAATTCACGCACAC
419	GAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCAATCAGCTTATCGCTGTTG
420	GAGGAGAAGCCCGGTTTCATAATGTAAATTCACGCACAC
426	GGTACGGAGAATGAGAAGTCATCAATGCACGAAGCAGCAC
427	GTGCTGCTCGTGATTGATGACTTCTCATTCTCCGTACC
428	CGCATTAAATGCACGCAACGCGGCCGCTGCGGCTTCTGCCCTTTTCTTCTG

429	CAGAAGGGGAAAAAGGGCAGAAGCCGCAGCGGCCGCGTTGCGTGCAATTAATGCG
8F	GTGGATCCATGAATCAGCTTATCGCTGT
K39F	AGTCAGAGTTCTGGCGCAAGCA
K39R	TGCTTGCGCCAGAACTCTGACT
9R	TAGGATCCTTATAATGTAAATTCACGCACAC
DDNmF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAATCAGCTTATCGCTGT
DDNmR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATAATGTAAATTCACGCACAC
INT1F	TTAGGCGCGCCGGAAGGGTTCGAAAATTAATTAG
INT1R	CCAACCGGTCTGTGGCTTCATTATACCCAT
INT2F	GGAACCTCGAGGGGTCAAGAAGTGGAATATTAG
INT2R	AATGGGCCCAAGCTTGCGGCCGCCATATGAGATCTCCCCTCTTCATTTCTCG
DDnonSTOP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATGTAAATTCACGCACAC

QUADRO 1 – LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.

3.5.1 Construção de plasmídeos para deleção do gene *tcdlp* por nocaute gênico

3.5.1.1 Amplificação e clonagem das regiões a montante e a jusante do gene *Tcdlp* no vetor pKS-neo

As regiões a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) do gene *Tcdlp*, respectivamente denominadas de UPSDLP (422 pb) e DOWNDLP (653 pb), foram amplificadas por PCR, usando os pares de oligonucleotídeos iniciadores 5NEOF/5NEOR e 3NEOF/3NEOR, respectivamente. O vetor pKS-neo (DE SOUZA *et al.*, 2010) possui os sítios *SalI* e *EcoRI* flanqueando o gene *npt* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico neomicina (G418). Neste trabalho, para facilitar o entendimento do processo de nocaute gênico, o gene *npt* foi chamado de neo, referindo-se à marca de seleção. Desse modo, os iniciadores para a amplificação da região a montante do gene *Tcdlp*, aqui denominada de UPSDLP, contém o sítio *SalI* e os iniciadores da região a jusante, identificado como DOWNDLP, contém o sítio *EcoRI*. As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng de DNA total de *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂

1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos iniciadores a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche). O DNA purificado foi digerido com enzimas de restrição apropriadas para a clonagem dos fragmentos no vetor pKS-neo também digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante da clonagem das regiões UPSDLP e DOWNDLP foi denominado de pKS-UPSneoDOWN. Bactérias *E. coli* cepa XL1-Blue foram transformadas com a ligação. A seleção dos clones foi realizada através da técnica de palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.8.1 e 3.8.2).

3.5.1.2 Amplificação e clonagem das regiões a montante e a jusante do gene *Tcdlp* no vetor pKS-higro

As regiões a montante (upstream) e a jusante (downstream) do gene *Tcdlp*, respectivamente denominadas de UPSDLP (422 pb) e DOWNDLP (653 pb), foram amplificadas por PCR, usando os pares de oligonucleotídeos iniciadores 5HYGF/5HYGR e 3HYGF/3HYGR, respectivamente. O vetor pKS-higro (DE SOUZA et al., 2010) possui os sítios *Xba*I e *Bam*HI flanqueando o gene *hph* que codifica a enzima higromicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico higromicina B. Neste trabalho, para facilitar o entendimento do processo de nocaute gênico, o gene *hph* foi chamado de higro, referindo-se à marca de seleção. Desse modo, os iniciadores para a amplificação da região a montante do gene *Tcdlp*, aqui denominado de UPSDLP, contém o sítio *Xba*I e os iniciadores da região a jusante, identificado como DOWNDLP, contém o sítio *Bam*HI. As reações de PCR foram realizadas conforme o item anterior. O material amplificado foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche). O DNA purificado foi digerido com enzimas de restrição apropriadas para a clonagem dos fragmentos no vetor pKS-higro também digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante da clonagem das regiões UPSDLP e DOWNDLP foi denominado de pKS-UPShigroDOWN. Bactérias

E. coli cepa XL1-Blue foram transformadas com a ligação. A seleção dos clones foi realizada através da técnica de palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.8.1 e 3.8.2).

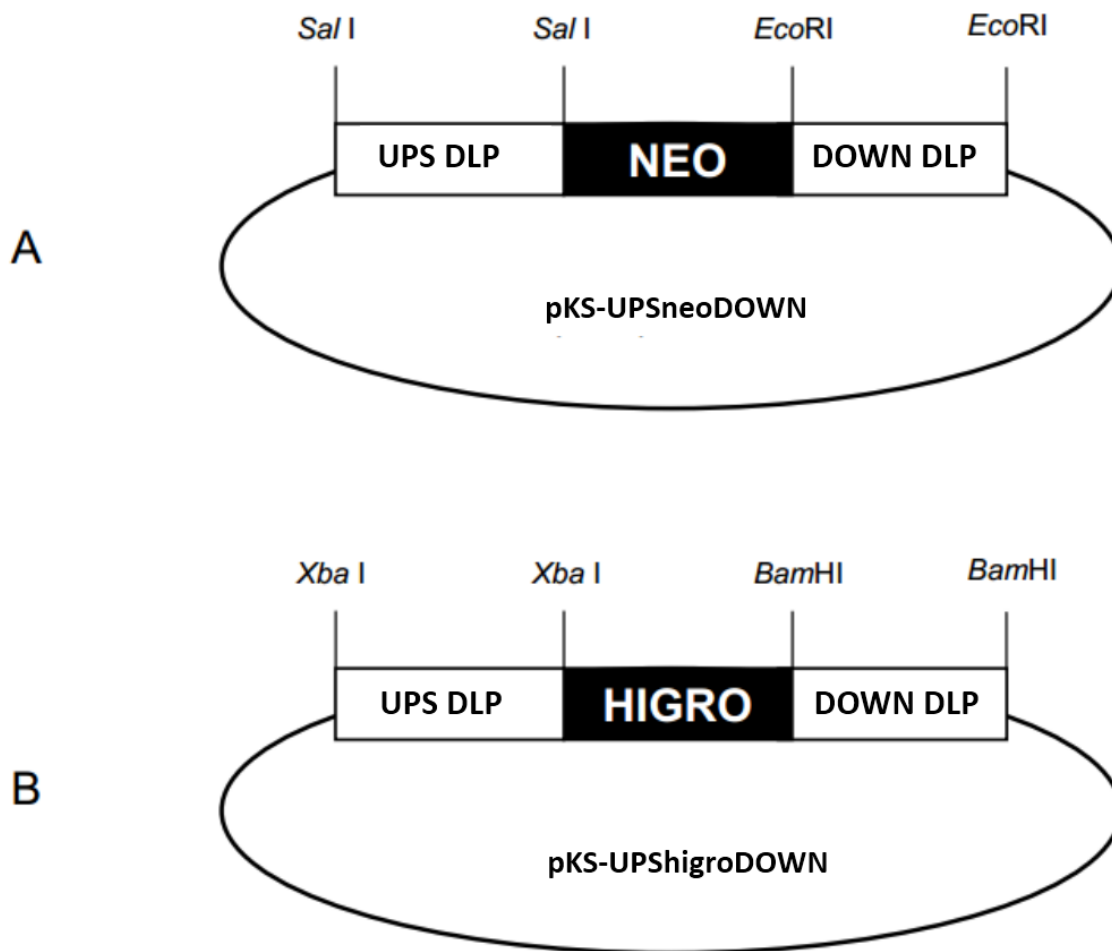


FIGURA 16 - ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GENE *Tcdlp* UTILIZANDO AS REGIÕES INTERGÊNICAS.

3.5.1.3 Amplificação dos cassetes UPS-NEO-DOWN e UPS-HIGRO-DOWN para transfecção de *T. cruzi*

Os plasmídeos recombinantes pKS-UPSneoDOWN e pKS-UPShigroDOWN foram purificados pelo método da lise alcalina, usando o kit de minipreparação de plasmídeos (Qiagen). As *minipreps* foram utilizadas para a amplificação da região UPSneoDOWN (cassete NEO) e da região UPShigroDOWN (cassete HYG) por PCR, usando os pares

de iniciadores 5NEOF/3NEOR e 5HYGF/5HYGR, respectivamente. As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 2 ng do plasmídeo pKS-UPSneoDOWN ou pKS-UPShigroDOWN, 10 pmol dos respectivos pares de iniciadores, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel preparativo de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídeo (1 µg/ml) e a banda correspondente a cada cassete foi removida do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi. O DNA foi purificado por eletroeluição, dentro de saco de diálise, nas condições de 100 V por 1 h em tampão TBE. Para obter massa de DNA suficiente para a transfecção (25 µg), foram feitas 10 reações de PCR com 100 µl cada uma.

3.5.1.4 Amplificação e clonagem das regiões amino-terminal e carboxi-terminal de *Tcdlp* nos vetores pNEO2 e pHIGRO2

Os vetores pNEO2 e pHIGRO2 são versões mais recentes dos vetores citados nos itens anteriores pKS-neo e pKS-higro. Abaixo segue o esquema geral desta nova versão de vetores para nocaute gênico em *T. cruzi* construídos por nosso grupo.

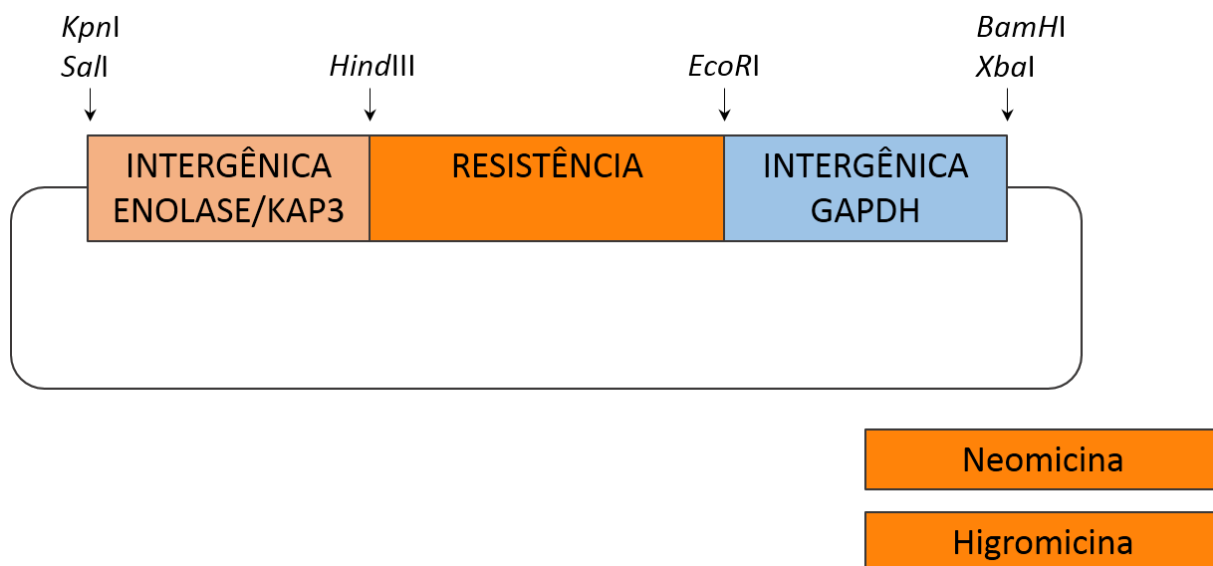


FIGURA 17 - ESQUEMA DOS VETORES DE CLONAGEM PARA NOCAUTE GÊNICO.

As regiões que correspondem à região amino-terminal (N-terminal) e carboxi-terminal (C-terminal) de *Tcdlp*, respectivamente denominadas de N-DLP (666 pb) e C-DLP (639 pb), foram amplificadas por PCR, usando os pares de oligonucleotídeos iniciadores 114F/115R e 111F/112R, respectivamente. As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 100 ng de DNA total de *T. cruzi* Dm28c, 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador MWG (Biotech) nas seguintes condições: desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos iniciadores a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min. O material amplificado foi purificado utilizando fenol/clorofórmio conforme protocolo citado no item 3.11. O material purificado (N-DLP) foi digerido com as enzimas de restrição *KpnI* e *SalI* e clonadas nos vetores pNEO2 e pHIGRO2 também digeridos com estas enzimas de restrição. Após transformação e seleção dos clones positivos, estes plasmídeos foram utilizados para uma segunda etapa de clonagem. O fragmento (C-DLP) purificado foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *XbaI* e clonado nos vetores pNEO2 e pHIGRO2 contendo o fragmento N-DLP e também digeridos com as enzimas *BamHI* e *XbaI*. Bactérias *E. coli* cepa XL1-Blue foram transformadas com a ligação. A seleção dos clones foi realizada através da técnica de palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.8.1 e

3.8.2). Os plasmídeos resultantes destas clonagens foram denominados pNEO-N+CDLP e pHIGRO-N+CDLP.

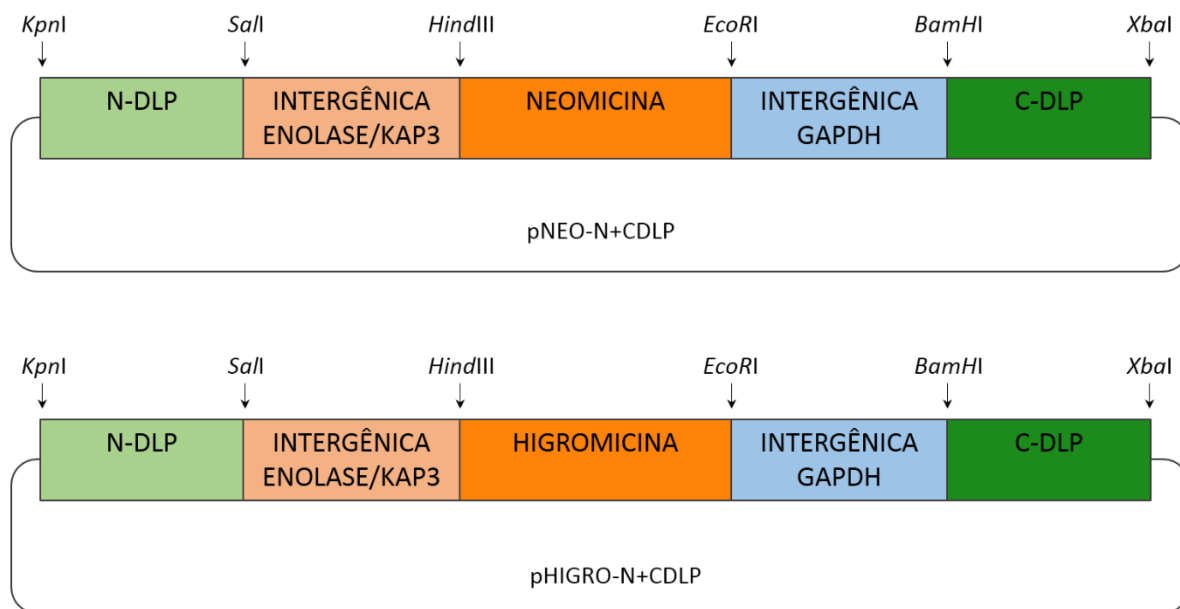


FIGURA 18 - ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DOS VETORES UTILIZADOS PARA O NOCAUTE DO GENE *Tcdlp* UTILIZANDO AS REGIÕES CODIFICANTES.

3.5.1.5 Amplificação dos cassetes N-DLPneoC-DLP e N-DLPhigroC-DLP para transfecção de *T. cruzi*

Os plasmídeos pNEO-N+CDLP e pHIGRO-N+CDLP foram purificados pelo método da lise alcalina, usando o kit de minipreparação de plasmídeos (Qiagen). As *minipreps* foram utilizadas para a amplificação dos cassetes N-DLPneoC-DLP e N-DLPhigroC-DLP, respectivamente. Na reação de PCR utilizou-se os iniciadores 114 F e 112R. As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 2 ng do plasmídeo pNEO-N+CDLP ou pHIGRO-N+CDLP, 10 pmol dos respectivos pares de iniciadores, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 unidades de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador MWG (Biotech) nas seguintes condições: desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min. O material

amplificado foi submetido à eletroforese em gel preparativo de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídeo (1 µg/ml) e a banda correspondente a cada cassete foi removida do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi. O DNA foi purificado por eletroeluição, dentro de saco de diálise, nas condições de 100 V por 1 h em tampão TBE. Para obter massa de DNA suficiente para a transfecção (25 µg), foram feitas 10 reações de PCR com 100 µl cada uma.

3.5.2 Expressão do gene *Tcdlp* utilizando sistema bacteriano

3.5.2.1 Clonagem do gene *Tcdlp* no vetor pGEX4T

A região codificante do gene *Tcdlp* foi amplificada com os iniciadores 1F e 2R, a partir do DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c. A sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Sma*I foi adicionada na extremidade 5' do iniciador 1F, enquanto a sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Not*I foi adicionada à extremidade 5' do iniciador 2R. As condições da reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA total *T. cruzi*, 10 pmol de cada iniciador, 200µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, tampão Taq DNA polimerase 1x, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, EUA) ou MWG (Biotech) com a desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos constando de desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos iniciadores a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min e 30 s. O material amplificado foi purificado usando o kit High Pure PCR Purification (Roche) e digerido com as enzimas de restrição *Sma*I e *Not*I, com uso de 20 U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 20µl, por 16 h a 37 °C. O material foi novamente purificado e utilizado para ligação com o vetor pGEX4T digerido com as mesmas enzimas. Bactérias *E. coli* cepa XL1-Blue foram transformadas com a ligação. A seleção dos clones foi realizada através da técnica de palitagem ou de PCR de colônia (itens 3.8.1 e 3.8.2).

3.5.2.2 Amplificação e clonagem de *Tcdlp* no vetor pET-46 Ek/LIC

O fragmento correspondente ao gene *tcdlp* foi amplificado utilizando os iniciadores 419 e 420. As condições de amplificação foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* em uma reação com volume final de 50 µL contendo 10 pmol de cada um dos iniciadores, tampão *Accume Iniciador Pfx* e a enzima *Platinum® Pfx* DNA Polimerase diluídos conforme recomendado pelo fabricante. A ciclagem consistiu de um passo inicial de dois min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e dois min a 68 °C. Purificamos a banda correspondente por extração de gel utilizando o kit *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen). Em seguida, o material purificado foi utilizado como molde para uma segunda reação de PCR utilizando os iniciadores 316 e 420. Esta segunda etapa de PCR foi utilizada para inserir o fragmento de recombinação no fragmento a ser clonado, já que o vetor pET-46 Ek/LIC utiliza um sistema de clonagem por recombinação (clonagem independente de ligação ou LIC, de *ligation independent cloning*). Em seguida, 0,1 pmol desse material foi tratado com 0,5U T4 DNA polimerase (Invitrogen), tampão específico 1x, dATP 2,5 mM e DTT 10 mM em um volume final de 10µL, por 30 min a temperatura ambiente, depois a enzima foi inativada por 20 min a 75 °C. A reação chamada de anelamento se deu adicionando 2 µL da reação anterior a 1 µL do vetor pET-46 Ek/LIC presente no kit, depois de cinco min a temperatura ambiente, foi adicionado 1 µL de EDTA 25 mM. O material foi incubado por cinco min e em seguida mantido em gelo, até a transformação em bactérias cálcio-competentes da linhagem TG1. Após a transformação a cultura foi semeada em placas de LB contendo carbenicilina (50 µg/L) e incubadas a 37 °C durante 16 h.

A verificação dos clones positivos foi realizada através de PCR de colônias. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo carbenicilina (50 µg/mL), e incubada a 37° C por 16 h sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito no item 3.9. Este plasmídeo foi denominado pET46Ek/LIC-TcDLP.

3.5.2.3 Amplificação e clonagem do gene *Tcdlp* contendo a mutação MAGMH391-395AAAAA

Para inserir a mutação MAGMH391-395AAAAA, foram feitas duas etapas de

amplificação por PCR. Na primeira etapa amplificamos dois fragmentos do gene de interesse separadamente. Em uma reação utilizamos os iniciadores 419 e 429, produzindo um fragmento de aproximadamente 1200 pb (pares de base). Na outra reação, utilizamos os iniciadores 428 e 420 para amplificar um fragmento de aproximadamente 750 pb. Após confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose, purificamos as duas bandas de interesse por extração de gel utilizando o *kit* QIAquick *gel extraction kit* (Qiagen). Os produtos amplificados foram misturados e serviram como molde para a segunda etapa de amplificação. Foram utilizados os iniciadores 419 e 420 para amplificar o fragmento inteiro de 1962 pb. Vale aqui ressaltar que os iniciadores 429 e 428 foram sintetizados com as mutações necessárias, trocando a sequência de cinco códons que traduziria a sequência dos resíduos de aminoácidos MAGMH que ocupam a posição 391 a 395 da sequência aminoacídica, para a sequência de cinco alaninas. Também é importante salientar que utilizamos uma polimerase de alta fidelidade em todos os procedimentos de amplificação de fragmentos contendo mutações de interesse. As condições das reações de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA molde (foi utilizado o plasmídeo pET46Ek/LIC-TcDLP na primeira etapa e a mistura das bandas purificadas, na segunda etapa de reação de PCR), 10 pmol de cada iniciador, 200µM de cada dNTP, MgSO₄ 2mM, tampão específico KOD 1x, 0,4U de KOD HiFi DNA polimerase (Merck Millipore). A ciclagem consistiu de um passo inicial de quatro min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e um minuto e meio a 68 °C. Purificamos a banda correspondente por extração de gel utilizando o kit QIAquick *gel extraction kit* (Qiagen). Em seguida, o material purificado foi utilizado como molde para uma segunda reação de PCR utilizando os iniciadores 316 e 420. Novamente a banda de interesse foi purificada por extração de gel. Em seguida, 0,1 pmol desse material foi tratado com 0,5U de T4 DNA polimerase (Invitrogen), tampão de reação 1x, dATP 2,5 mM e DTT 10 mM em um volume final de 10µL, por 30 min a temperatura ambiente, depois a enzima foi inativada por 20 min a 75 °C. A reação de anelamento se deu adicionando 2 µL da reação anterior a 1 µL do vetor pET-46 Ek/LIC presente no kit, depois de cinco min a temperatura ambiente, foi adicionado 1 µL de EDTA 25mM, depois de mais cinco minuto de incubação, a reação foi colocado em gelo para seguida etapa de transformação em bactérias cálcio-competentes. Utilizou-se a linhagem TG1 de *E. coli*.

Após a transformação a cultura foi semeada em placas de LB contendo carbenicilina (50 µg/L) e incubadas a 37 °C durante 16 h.

A verificação dos clones positivos foi realizada através de PCR de colônias. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo carbenicilina (50 µg/mL), e incubada a 37° C por 16 h sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito no item 3.9. Este plasmídeo foi denominado pET46Ek/LIC-TcDLP_{MAGMH391-395}AAAAA.

3.5.2.4 Amplificação e clonagem do gene *Tcdlp* contendo a mutação Δ L4

Para inserir a mutação Δ L4, foram feitas duas etapas de amplificação por PCR. Na primeira etapa amplificamos dois fragmentos do gene de interesse separadamente. Em uma reação utilizamos os iniciadores 419 e 427, produzindo um fragmento de aproximadamente 1550 pb (pares de base). Na outra reação, utilizamos os iniciadores 426 e 420 para amplificar um fragmento de aproximadamente 300 pb. Foram utilizados os iniciadores 419 e 420 para amplificar o fragmento inteiro de aproximadamente 1850 pb. Vale aqui ressaltar que os iniciadores 427 e 426 foram sintetizados de tal maneira que saltasse a região correspondente ao Loop 4 da proteína TcDLP, conforme protocolo descrito por Hansson *et al*, (2008). As condições das reações de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA molde (foi utilizado o plasmídeo pET46Ek/LIC-TcDLP na primeira etapa e a mistura das bandas purificadas, na segunda etapa de reação de PCR), 10 pmol de cada iniciador, 200µM de cada dNTP, MgSO₄ 2mM, tampão específico KOD 1x, 0,4U de KOD HiFi DNA polimerase (Merck Millipore). A ciclagem consistiu de um passo inicial de quatro min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e um minuto e meio a 68 °C. O DNA amplificado foi extraído do gel e tratado com T4 DNA polimerase como descrito anteriormente. A reação de anelamento se deu adicionando 2 µL da reação anterior a 1 µL do vetor pET-46 Ek/LIC presente no kit, depois de cinco min a temperatura ambiente, foi adicionado 1 µL de EDTA 25mM, depois de mais cinco minutos, a reação foi colocada em gelo para segunda etapa de transformação em células cálcio-competentes. Utilizou-se a linhagem TG1 de *E. coli*. Após a transformação a cultura foi semeada em placas de LB contendo carbenicilina (50 µg/L) e incubadas a 37 °C durante 16 h.

A verificação dos clones positivos foi realizada através de PCR de colônias. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo carbenicilina (50 µg/mL), e incubada a 37° C por 16 h sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito no item 3.9. Este plasmídeo foi denominado pET46Ek/LIC-TcDLPΔL4.

3.5.2.5 Amplificação e clonagem do gene *tcdlp* contendo a mutação MAGMH391-395AAAA/ΔL4

Para inserir a mutação MAGMH391-395AAAA/ΔL4, foram feitas duas etapas de amplificação por PCR. Na primeira etapa amplificamos dois fragmentos do gene de interesse separadamente. Em uma reação utilizamos os iniciadores 419 e 427, produzindo um fragmento de aproximadamente 1550 pb (pares de base). Na outra reação, utilizamos os iniciadores 426 e 420 para amplificar um fragmento de aproximadamente 300 pb. Foram utilizados os iniciadores 419 e 420 para amplificar o fragmento inteiro de 1962 pb. As condições das reações de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA molde (foi utilizado o plasmídeo pET46Ek/LIC-TcDLPMAGMH391-395AAAA na primeira etapa e a mistura das bandas purificadas, na segunda etapa de reação de PCR), 10 pmol de cada iniciador, 200µM de cada dNTP, MgSO₄ 2mM, tampão específico KOD 1x, 0,4U de KOD HiFi DNA polimerase (Novagen). A ciclagem consistiu de um passo inicial de quatro min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C e um minuto e meio a 68 °C. Todas as etapas de extração, purificação e reparo do DNA amplificado bem como a clonagem no vetor pET-46 Ek/LIC e transformação de bactérias foram feitas como descrito anteriormente. Este plasmídeo foi denominado pET46Ek/LIC-TcDLPMAGMH391-395AAAA/ΔL4.

3.5.3 Construção de plasmídeos para os ensaios de efeito dominante negativo

3.5.3.1 Amplificação e clonagem do gene *Tcdlp* contendo a mutação K39A

Para inserir a mutação K39A, foram feitas duas etapas de amplificação por PCR.

Na primeira etapa amplificamos dois fragmentos do gene de interesse separadamente. Em uma reação utilizamos os iniciadores 8F e K39R, produzindo um fragmento de aproximadamente 120 pb (pares de base). Na outra reação, utilizamos os iniciadores K39AF e 9R para amplificar um fragmento de aproximadamente 1800 pb. Após confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos foram misturados e purificados utilizando o kit High Pure PCR Purification (Roche). A segunda etapa de PCR foi, então, realizada utilizando este material como molde e os iniciadores utilizados foram o 8F e o 9R para amplificar o fragmento inteiro de 1962 pb. Vale aqui ressaltar que os iniciadores K39AF e K39AR foram sintetizados com a mutação necessária, trocando a sequência do códon que traduziria um lisina na posição 39, para a sequência de uma alanina. As condições das reações de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA molde, 10 pmol de cada iniciador, 200 μ M de cada dNTP, MgSO_4 2 mM, tampão Taq DNA polimerase *High Fidelity* 1x, 1U de Platinum Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen). A temperatura de extensão desta polimerase é de 68 °C. Após a segunda etapa de PCR, o material amplificado foi purificado utilizando fenol/clorofórmio. Após centrifugação, o sedimento foi secado e ressuspenso em água para em seguida ser clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Bactérias *E. coli* cepa Top10F' foram transformadas com a ligação e selecionadas em placas ampicilina/IPTG/Xgal. Selecionamos quatro colônias brancas para serem testadas por PCR de colônia (item 3.8.2). Os clones positivos foram sequenciados para verificar se a inserção da mutação foi correta. Esse plasmídeo foi identificado como pGEM-TcDLPK39A.

3.5.3.2 Clonagem de *Tcdlpk39A* no vetor pGW-DDNterm utilizando a plataforma Gateway® (Invitrogen)

O plasmídeo pGEM-TcDLPK39A foi utilizado como molde para amplificar o gene para clonagem utilizando a plataforma Gateway®. Os iniciadores utilizados para essa amplificação foram os DDDnmF e DDDnmR. As condições desta reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA molde, 10 pmol de cada iniciador, 200 μ M de cada dNTP, 2mM de MgSO_4 , tampão Taq DNA polimerase 1x *High Fidelity*, 1U de Platinum Taq DNA

polimerase de alta fidelidade (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo MWG (Biotech) com a desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos constando da desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos iniciadores a 55 °C por 30 s e extensão a 68 °C por 2 min. O produto da amplificação foi purificado utilizando o protocolo de purificação por fenol/clorofórmio (3.11).

O próximo passo foi gerar o clone de entrada. Para isso é necessário que ocorra recombinação entre os sítios específicos *attB* (*attachment*), inseridos nos produtos de PCR, e *attP* do vetor pDONR™221 (figura X), dando origem aos sítios *attL*, no vetor, e *attR*, no produto intermediário. A enzima utilizada nesta reação é composta por uma integrase do bacteriófago lambda (Int) e um fator de integração ao hospedeiro de *Escherichia coli* (IHF) (*BP Clonase™ enzyme mix*).

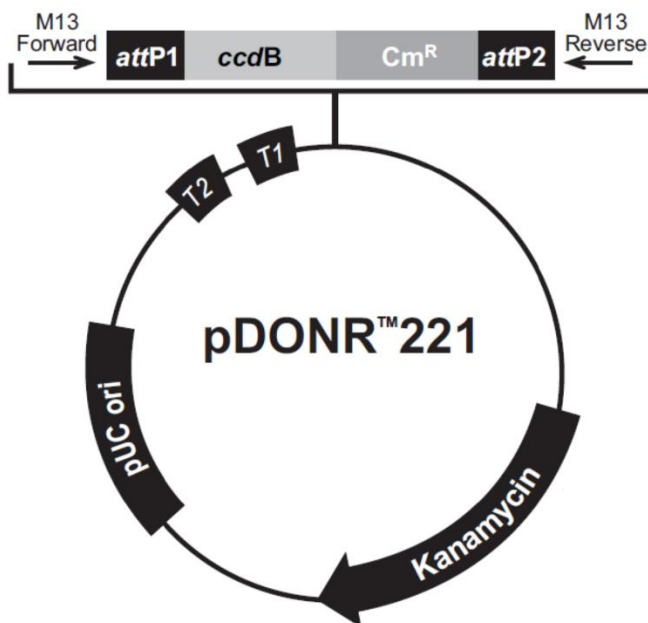


FIGURA 19 - MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221.

A inserção dos produtos de PCR no vetor pDONR™221, denominada de reação BP, foi realizada conforme recomendação do fabricante (*Gateway BP clonase Enzyme mix*). A reação que continha 150 ng do produto de PCR com o sítio *attB*, 150 ng do plasmídeo pDONR™221, num volume final de 8 µL completados com TE, e 1 µL de *BP*

Clonase™ enzyme mix foi incubada a 25°C por 16 h. Após esta etapa, foi adicionado 1 µL de proteinase K (2 mg/mL) e a reação foi incubada por 10 min a 37°C. Após a conclusão dessa etapa, os clones em pDONR™221 foram transformados em células cálcio-competentes *E.coli* da linhagem DH5a, conforme protocolo de transformação de células cálcio competentes (item 3.8). Para tanto, os 10 µL da reação BP foi adicionada a 50 µL de células cálcio-competentes. Após transformação, a cultura foi semeada em placa de LB contendo kanamicina (25 mg/mL) e incubadas a 37° C durante 16 h.

Para verificar a presença de clones com os insertos de interesse, foram feitas PCR de colônia. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo kanamicina (25 mg/mL) e incubadas por 16 h a 37° C sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada com o kit QIAprep® *Spin Miniprep* (Qiagen) conforme orientações do fabricante seguindo o protocolo para uso em microcentrífuga.

Após esta etapa feita, foi necessário transferir o inserto para o vetor de destino. Neste caso trata-se de um vetor de expressão em tripanosomatídeos o qual podemos fusionar o domínio DD (domínio desestabilizador) na região aminoterminal da proteína de interesse. A transferência do inserto para o vetor de destino é facilitada pela recombinação dos sítios *attL* presentes no clone de entrada com os sítios *attR* do vetor (*LR Clonase™ enzyme mix*), originando o clone de expressão.

A troca de insertos entre os vetores de entrada e destino, denominada de reação LR, foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway LR clonase Enzyme mix*). Para isso, 150 ng do vetor de entrada pDONR™221 contendo o gene *tcdlpk39a* foram adicionados a 150 ng do vetor aqui denominado pGW-DDNterm (gentilmente cedido pela Dra. Andréa Ávila do Instituto Carlos Chagas). O volume final da reação foi ajustado para 10 µL com TE e foi adicionado 1 µL de *LR Clonase™ enzyme mix*. A reação foi incubada a 25°C por 16 h. Após esta etapa, foi adicionado 1 µL de proteinase K (2 mg/mL) e a reação foi incubada por 10 min a 37°C. Células cálcio-competentes de *E. coli* da linhagem DH5a foram transformadas com o produto da recombinação, conforme descrito anteriormente, semeadas em placas de LB contendo ampicilina (100 µg /L) e incubadas a 37°C durante 16 h.

A verificação de clones positivos foi realizada através de PCR de colônias. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100

$\mu\text{g/mL}$), e incubada a 37°C por 16 h sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito no item 3.9.

3.5.3.3 Construção dos pNEO3xFlag e pNEO3xHA

Os vetores pNEO3xFlag e pNEO3xHA foram construídos a partir de modificações feitas em um vetor (pTcGW-ProtCcarboxi) cedido pelo Michel Batista (Instituto Carlos Chagas). Este vetor faz parte da plataforma pTcGW criado no Instituto Carlos Chagas (BATISTA et al., 2010).

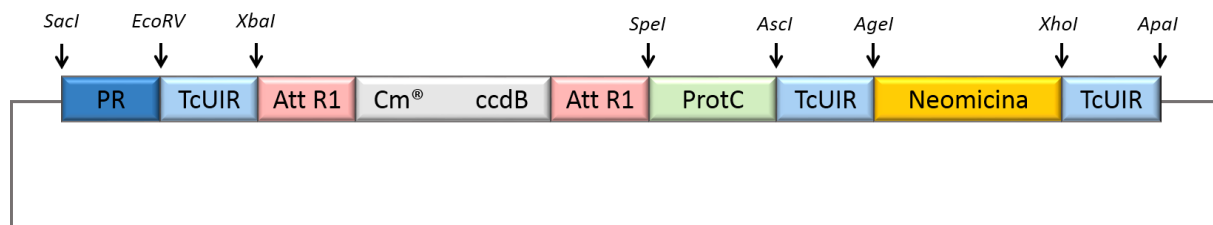


FIGURA 20 – ESQUEMA DO VETOR pTcGW-ProtCcarboxi.

Primeiramente, foi trocada a região intergênica denominada TcUIR localizada a jusante do gene que confere resistência à neomicina ou G418. Para isso, amplificamos um fragmento, de aproximadamente 520pb, da região intergênica do gene Tc00.1047053506295.100 utilizando os iniciadores INT2F e INT2R. Após confirmação da amplificação do fragmento por eletroforese de DNA em gel de agarose 1%, o material foi purificado utilizando fenol/clorofórmio. Após as etapas de purificação, o material foi ressuspensão em $15\mu\text{L}$ de água e digerido com as enzimas de restrição *ApaI* e *XhoI* por 16 h a 37°C , bem como o vetor a ser modificado. A purificação do material digerido foi feita por extração em gel utilizando a técnica de purificação por ponteira com filtro (3.10). O vetor e o inserto foram ligados utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante. Células cálcio-competentes de *E. coli* ccdB resistente foram transformadas com a ligação, semeadas em placas de LB contendo ampicilina ($100\mu\text{g/mL}$) e cloranfenicol ($34\mu\text{g/mL}$) e incubadas a 37°C durante 16 h.

A verificação de clones positivos foi realizada através de PCR de colônias. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100

µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL), e incubada a 37° C por 16 h sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito no item 3.9.

O passo seguinte foi amplificar um fragmento, de aproximadamente 460 pb, da região intergênica do gene Tc00.1047053504069.80 utilizando os iniciadores INT1F e INT1R. Após confirmação da amplificação do fragmento por eletroforese de DNA com gel de agarose 1%, o material foi purificado utilizando fenol/clorofórmio. Após as etapas de purificação, o material foi ressuspenso em 15 µL de água e digerido com a enzima de restrição *AgeI* por 2 h a 37 °C, bem como o vetor a ser modificado contendo o fragmento denominado INT2. Após outra purificação, o material foi digerido com *Ascl*. Após inativação por calor, o vetor e o inserto foram ligados utilizando T4 DNA ligase (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante. *E. coli* cálcio-competentes ccdB-resistentes foram transformadas com a ligação, semeadas em placas de LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e incubadas a 37 °C durante 16 h.

A verificação de clones positivos foi realizada através de PCR de colônias. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL), e incubada a 37° C por 16 h sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme descrito no item 3.9.

Depois que as regiões intergênicas foram trocadas, seguimos com a troca da ProteínaC pelas etiquetas 3xFlag (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK) e 3xHA (YPYDVPDYAGYPYDVPDYAGSYYPYDVPDYA). A sequência dessas duas etiquetas, contendo os sítios específicos para clonagem, foram sintetizadas pela empresa *GenScript* e clonadas no vetor pUC57. Estes dois plasmídeos e o vetor contendo as regiões intergênicas 1 e 2 foram digeridos com as enzimas de restrição *Ascl* e *SpeI* por 1 h a 37 °C. As bandas de interesse foram purificadas por extração em gel e o material purificado foram clonados, obtendo dois vetores de expressão em *T. cruzi* denominados de pNEO3xFlag e pNEO3xHA.

3.5.3.4 Amplificação e clonagem do gene *Tcdlp* e seus mutantes nos vetores de expressão pNEO3xFlag e pNEO3xHA

Os vetores pNEO3xFlag e pNEO3xHA utilizam da tecnologia Gateway® para

clonagem. Para isso, primeiramente foi preciso clonar os insertos de interesse no vetor de entrada pDONRTM221. Vale lembrar que as etiquetas, nestes vetores, são para fusões carboxi-terminal. Por isso, o iniciador reverso teve que ser desenhado não contendo o códon de parada do gene *tcdlp*, esse iniciador foi denominado de DDnonstopR.

Os insertos foram amplificados utilizando os iniciadores DDDnmF e DDnonstopR. As condições desta reação de PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA molde (ver lista abaixo), 10 pmol de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgSO₄, tampão Taq DNA polimerase 1x *High Fidelity*, 1U de Platinum Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen). A reação de PCR foi processada no termociclador modelo MWG (Biotech) com a desnaturação do material por 4 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos constando da desnaturação a 94 °C por 30 s, hibridização dos iniciadores a 55 °C por 30 s e extensão a 68 °C por 2 min. O produto da amplificação foi purificado utilizando o protocolo de purificação por fenol/clorofórmio (3.11). Abaixo segue a lista de plasmídeos usados com molde na reação de PCR citada acima:

- pET46Ek/LIC-TcDLP;
- pET46Ek/LIC-TcDLPMAGMH391-395AAAAA;
- pET46Ek/LIC-TcDLPΔL4;
- pET46Ek/LIC-TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4;
- pGEM-TcDLPK39A.

A inserção dos produtos de PCR no vetor pDONRTM221, denominada de reação BP, foi realizada conforme descrito anteriormente.

Para verificar a presença de clones com os insertos de interesse, foram feitas PCR de colônia. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo kanamicina (25 mg/mL) e incubadas por 16 h a 37° C sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada com o kit QIAprep® *Spin Miniprep* (Qiagen) conforme orientações do fabricante seguindo o protocolo para uso em microcentrífuga. Os plasmídeos gerados foram identificados como:

- pDONR-TcDLP;
- pDONR-TcDLPMAGMH391-395AAAAA;
- pDONR-TcDLPΔL4;

- pDONR-TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4;
- pDONR-TcDLPK39A.

Após esta etapa feita, foi necessário transferir o inserto para o vetor de destino. Neste caso, como já explicado, trata-se de um vetor de expressão em tripanosomatídeos o qual podemos fusionar as etiquetas 3xFlag ou 3xHA na região carboxi-terminal da proteína de interesse. A troca de insertos entre os vetores de entrada e destino, denominada de reação LR, foi realizada conforme descrito anteriormente.

A verificação de clones positivos foi realizada através de PCR de colônias. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), e incubada a 37° C por 16 h sob agitação (200 rpm). A purificação do plasmídeo foi realizada conforme item 3.9. Os plasmídeos gerados foram denominados de:

- pNEO3xFlag-TcDLP;
- pNEO3xFlag-TcDLPMAGMH391-395AAAAA;
- pNEO3xFlag-TcDLP Δ L4;
- pNEO3xFlag-TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4;
- pNEO3xFlag-TcDLPK39A;
- pNEO3xHA-TcDLP;
- pNEO3xHA-TcDLPMAGMH391-395AAAAA;
- pNEO3xHA-TcDLP Δ L4;
- pNEO3xHA-TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4;
- pNEO3xHA-TcDLPK39A.

3.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.6.1 Purificação da proteína recombinante GST-TcDLP

3.6.1.1 Teste de expressão e solubilidade de GST-TcDLP

Uma colônia recombinante XL1-Blue contendo o plasmídeo pGEX4T-TcDLP foi inoculada em 2 mL de meio LB com o antibiótico ampicilina (100 μ g/mL) e cultivadas

durante 16 h a 37 °C (pré-inóculo). Uma alíquota de 100 µl do pré-inóculo foi inoculada em 2 tubos contendo 10 mL de meio LB e antibiótico. As culturas foram incubadas por uma h a 37 °C. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM a uma das culturas (cultura induzida). A cultura sem adição de IPTG (não induzida) serviu de controle negativo da expressão. Ambas as culturas foram incubadas a 37 °C por mais três h. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g por 2 min e ressuspensas em 500 µl de PBS. A suspensão bacteriana foi lisada por ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co.) por 2 pulsos de 5 s em potência 3. Vinte microlitros desses extratos das culturas bacterianas (induzida e não induzida) foram adicionados a 5 µl de Tampão de amostra 4x, sendo em seguida incubados por 5 min a 100 °C. Cada amostra foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, com SDS (SDSPAGE), a 28 mA, como descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese as proteínas foram coradas com solução de Coomassie Blue G-250 e descoradas com trocas sucessivas de solução de descoloração.

Para testar a solubilidade das proteínas recombinantes, as culturas bacterianas foram induzidas como descrito anteriormente. Após a indução, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 7.000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 3 mL de solução de sonicação (contendo 100 µg/µL de lisozima) e incubados por 30 min a 4 °C. A suspensão bacteriana foi lisada por ultrassom, com 3 pulsos de 15 seg (potência 7). Após a lise e centrifugação, o sobrenadante e o sedimento de cada clone testado foram analisados em SDS-PAGE para analisar a solubilidade da proteína recombinante GST-TcDLP.

3.6.1.2 Purificação de GST-TcDLP por lavagem de corpúsculos de inclusão

Esta técnica é utilizada para proteínas recombinantes insolúveis. Para a purificação de corpúsculos de inclusão, uma colônia recombinante foi inoculada em 3 mL de meio LB + ampicilina (100 µg/mL) e cultivada durante 16 h a 37 °C (pré-inóculo). Foram inoculados 2 mL do pré-inóculo em 200 mL de meio LB/ ampicilina (100 µg/mL), a cultura foi incubada por três h a 37 °C. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração

final de 1 mM à cultura. Após a indução, a cultura foi centrifugada a 7.000 x g por 10 min a 4 °C. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos em 10 mL de PBS e a lise foi realizada por sonicação como descrito no item anterior, mas antes se adicionou à suspensão bacteriana lisozima para uma concentração final de 0,5 mg/ml, por 30 min a temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo as proteínas recombinantes insolúveis na forma de corpúsculos de inclusão, foi ressuspenso em 5 ml de uma solução de suspensão de corpúsculo para cada 100 mL da cultura original. A solução foi centrifugada por 10 min a 12.000 x g a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se essa lavagem por mais duas vezes. O material então foi lavado com 10 mL de solução de PBS (para retirar o excesso de Triton X-100) e centrifugado por 10 min a 12.000 x g a 4 °C. O sedimento formado foi ressuspenso em 2 mL de PBS e adicionou-se PMSF para uma concentração final de 1 mM. A esse material foi adicionado 1 mL de tampão de amostra 4X e foi purificado por eletroforese em gel preparativo de poliacrilamida a 8%, com 15 cm de largura por 10 cm de altura. O gel foi submetido à eletroforese por 16 h a 20 mA. O gel foi corado com solução de KCl 100mM, a banda correspondente foi cortada e eletroeluída por 2 h a 60V em tampão de SDS-PAGE.

3.6.2 Purificação das proteínas recombinantes clonadas no vetor pET46 Ek/LIC

3.6.2.1 Teste de expressão e solubilidade das proteínas recombinantes clonadas no vetor pET46 Ek/LIC.

Os plasmídeos pET46Ek/LIC-TcDLP, pET46Ek/LIC-TcDLPMAGMH391-395AAAAA, pET46Ek/LIC-TcDLP Δ L4 e pET46Ek/LIC-TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4 foram transformados em bactérias *E. coli* cepa Rosetta2 (DE3) cálcio-competentes e as colônias geradas foram utilizadas para os testes de purificação.

Uma colônia de cada recombinante foi inoculada em 2 mL de meio TB com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e cultivadas durante 16 h a 37 °C (pré-inóculo). Uma alíquota de 50 µl de cada pré-inóculo foi inoculada em tubos contendo 10 mL de meio TB e antibióticos. As culturas foram incubadas a 37 °C até atingir

a OD₆₀₀ de 0,4. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 40 µM às culturas (culturas induzidas). A cultura sem adição de IPTG (não induzida) serviu de controle negativo da expressão. As culturas foram incubadas a 18 °C por 16 h. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g por 2 min e ressuspensas em tampão Hepes 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, MgCl₂ 2mM e inibidor de protease Pefabloc SC (Roche). Foi adicionada lisozima (0,5mg/mL) às suspensões bacterianas e incubadas a 25 °C, sob agitação, por 4 h. 20µL desses extratos das culturas bacterianas (induzida e não induzida) foram adicionados a 5 µl de Tampão de amostra 4x, sendo em seguida incubados por 5 min a 100 °C. O restante das culturas foram centrifugadas para separar o sobrenadante e o sedimento. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL do mesmo tampão de suspensão. 20µL de cada amostra foram adicionados a 5 µl de Tampão de amostra 4x, sendo em seguida incubados por 5 min a 100 °C. As amostras foram analisados em SDS-PAGE para analisar a expressão e solubilidade das proteína recombinantes.

3.6.2.2 Expressão e purificação de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4 em larga escala

Nas condições citadas no item anterior, TcDLP se mostrou praticamente insolúvel. A maior expressão e solubilidade foi obtida para a expressão de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4. Usamos então a expressão de pET46Ek/LIC-TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4 para purificação em larga escala.

O vetor pET46 Ek/LIC fornece a expressão de uma proteína recombinante fusionada a uma etiqueta de 6 histidinas (6xhis) na porção amino-terminal da proteína de interesse. Entre a proteína e a cauda 6xhis tem um sítio de reconhecimento para a enteroquinase. A sequência deste sítio de clivagem é DDDDK.

Uma colônia de Rosetta2(DE3) pET46Ek/LIC-TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4 foi inoculada em 100 mL de meio TB com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e cultivadas durante 16 h a 28 °C (pré-inóculo). 30 mL do pré-inóculo foi adicionado a 6 L de meio TB ampicilina/cloranfenicol. A cultura foi incubada a 37 °C até atingir a OD₆₀₀ de 0,4. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 40 µM à cultura e novamente incubada a 18 °C por 16 h. As bactérias foram

coletadas por centrifugação a 12.000 x g por 5 min e ressuspensas em 200 mL de tampão Hepes 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, MgCl₂ 2mM, acrescida de DNase I (Sigma) 1 µg/mL e inibidor de protease Pefablock 1mM (Roth, Karlsruhe, Alemanha). A suspensão de bactérias foi lisada por choque mecânico a alta pressão e a frio utilizando o Microfluidizer® (Microfluidics). Após o rompimento celular, o material foi incubado com benzonase por 45 min a 4 °C e centrifugado a 35.000 rpm por 45 min, 4 °C. O sobrenadante foi filtrado utilizando membrana 0,22 µm. Esse material foi então passado em coluna contendo 5 mL de resina Talon® (Clontech Laboratories) previamente equilibrada com 50mL de tampão de suspensão. A lavagem foi feita utilizando 150 mL da mesma solução tampão. Na eluição foi utilizado o tampão de suspensão acrescido de 100mM de imidazol. Na eluição foram recolhidas seis frações de 5 mL cada uma. As 2 ou 3 frações mais concentradas foram misturadas e acrescidas de β-Mercaptoetanol 2,8mM e protease 6xHis-Enteroquinase, a 4 °C por 16 h. Esta protease, em ambiente reduzido, é capaz de clivar o sítio DDDDK liberando a TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4 da cauda 6xHis aminoterminal. O passo seguinte foi dialisar o material com o tampão de suspensão com o objetivo de retirar o imidazol e o β-Mercaptoetanol. Após diálise, o material foi passado novamente em coluna contendo resina Talon®, previamente equilibrada. O material recolhido nesta passagem se encontra a proteína de interesse purificada. Os contaminantes, proteína recombinante não clivada e a protease ficam retidos na coluna. Em seguida, seguiu-se para a última etapa de purificação utilizando a técnica de cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel. Foi utilizado a coluna HiLoad 16/60 Superdex200 (Pharmacia) e o tampão contendo Hepes 25 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, MgCl₂ 2mM e DTT 2mM. As frações puras foram concentradas, aliquotadas e congeladas a -80 °C.

3.6.2.3 Expressão e purificação de *His₆*-TcDLP

Uma colônia de Rosetta2(DE3) pET46Ek/LIC-TcDLP foi inoculada em 100 mL de meio TB com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e cultivadas durante 16 h a 28 °C (pré-inóculo). 30 mL do pré-inóculo foi adicionado a 6 L de meio TB ampicilina/cloranfenicol. A cultura foi incubada a 37 °C até atingir a OD₆₀₀ de

0,4. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 40 μ M à cultura e novamente incubada a 18 °C por 16 h. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g por 5 min e ressuspensas em 200 mL de tampão Bicina 25 mM pH 8,6, NaCl 500 mM, MgCl₂ 2mM, β -Mercaptoetanol, acrescida de DNase I (Sigma) 1 μ g/mL e inibidor de protease Pefablock 1mM (Roth, Karlsruhe, Alemanha). A suspensão de bactérias foi lisada por choque mecânico a alta pressão e a frio utilizando o Microfluidizer® (Microfluidics). Após o rompimento celular, o material foi incubado com benzonase por 45 min a 4 °C e centrifugado a 35.000 rpm por 45 min, 4 °C. O sobrenadante foi filtrado utilizando membrana 0,22 μ m. Esse material foi então passado em coluna contendo 5 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada com 50mL do tampão de suspensão. A lavagem foi feita utilizando 300 mL do tampão Bicina 25 mM pH 8,6, NaCl 500 mM, MgCl₂ 2mM, β -Mercaptoetanol e imidazol 25mM. Foi utilizado o tampão de eluição com duas concentrações diferentes de imidazol:

- Tampão de eluição 1: Bicina 25 mM pH 8,6, NaCl 500 mM, MgCl₂ 2mM, β -Mercaptoetanol e imidazol 100mM.
- Tampão de eluição 2: Bicina 25 mM pH 8,6, NaCl 500 mM, MgCl₂ 2mM, β -Mercaptoetanol e imidazol 200mM.

Foram feitas 5 eluições de 0,5 mL com o tampão 1 e 3 eluições de 0,5 mL com o tampão 2. Na eluição foi utilizado o tampão de suspensão acrescido de 100mM de imidazol. Na eluição foram recolhidas seis frações de 5 mL cada uma. As cinco últimas frações foram misturadas, concentradas, alíquotadas e congeladas a -80 °C.

3.7 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS CÁLCIO-COMPETENTES

Foi utilizado o método do cloreto de cálcio descrito em Sambrook et al. (1989). Assim, uma colônia da cepa XL1-blue ou TOP10 de *E. coli* foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo tetraciclina 12,5 μ g/ml (no caso da XL1-Blue). A cultura foi incubada por 16 h a 37 °C sob agitação constante. Um mL desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB (inóculo de 1:100) pré-aquecido a 37 °C. As células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (densidade óptica_{600nm} = 0,5). A cultura foi então centrifugada a 5000 x g por 10 min a 4 °C e o sedimento obtido

foi suspenso em 50 mL (metade do volume original) de CaCl_2 100 mM gelado. A suspensão foi mantida no gelo por 40 min e em seguida, foi submetida a uma nova centrifugação de 5.000 x g. O sedimento foi ressuspenso em 2,0 mL (1/50 do volume da cultura original) de solução CaCl_2 50 mM e 14% de glicerol gelada. Foram aliqüotadas 100 µL dessa suspensão de células em microtubos e congelados a -80 °C.

3.8 TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

As reações de ligação foram incubadas no gelo por 30 min com 100 µL de bactérias competentes. Após este tempo, a mistura foi incubada a 42 °C durante 2 min (choque térmico) e colocada de novo no gelo. Em seguida, 1 mL de meio LB foi adicionado ao tubo e as células foram cultivadas a 37 °C por 1 h antes da semeadura. Volumes de 100 e 200 µL da cultura de bactérias transformadas foram espalhadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (LB, ágar 15% e antibiótico, dependendo do plasmídeo). As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C. Clones contendo plasmídeos recombinantes foram selecionados mediante a técnica de palitagem ou por PCR de colônia.

3.8.1 Seleção dos clones recombinantes através da técnica da palitagem (*toothpick*)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (*toothpick*) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de microcentrifuga e para a superfície do meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 10 µL do tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, usando o plasmídeo original como controle. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por aproximadamente 20 min e lavado com água ultrapura e analisado em luz ultravioleta. Os géis foram fotografados no sistema de fotodocumentação L-Pix (Loccus Biotecnologia).

3.8.2 Seleção dos clones recombinantes através da técnica PCR de colônias

As colônias foram coletadas e transferidas para o fundo de microtubos e para a superfície do meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 10 µl de água. Os tubos foram vortexados e incubados em banho-maria a 99 °C por 10 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados por cinco min a velocidade máxima. Um µL do sobrenadante de cada colônia foi utilizado como DNA molde em reação de PCR. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de fotodocumentação L-Pix (Loccus Biotecnologia).

3.9 PREPARAÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS PRODUTOS DE PCR (MINIPREP)

As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico de resistência e cultivadas por 18 h a 37 °C sob constante agitação. As células obtidas foram centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto e o sedimento obtido foi utilizado para a extração dos plasmídeos através do sistema “QIAprep spin miniprep kit” (QIAGEN). Nestas condições, cerca de 5 a 10 µg de DNA dos diferentes plasmídeos foram recuperados para serem utilizados posteriormente.

3.10 EXTRAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE UTILIZANDO PONTEIRA COM FILTRO

Nesta extração de DNA caseira, ponteiras (100-1000 µL) com filtro foi cortada a ponta ficando apenas a base contendo o filtro. Esta base foi encaixada em tubo pra microcentrífuga e lavada 2 vezes com água ultra pura a 3000 x g por 1 min. Em seguida, a mesma base foi colocado em outro tubo de microncentrífuga. O material a ser extraído

foi depositado na base do filtro e centrifugado a 3000 x g por 15 min. O material que passou pelo filtro e foi depositado no microtubo foi submetido a uma purificação utilizando fenol/clorofórmio, conforme descrito no item 3.11.

3.11 PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO FENOL/CLOROFÓRMIO

Ao material a ser purificado foi adicionado o mesmo volume da solução fenol/clorofórmio. Após intensa agitação até a formação de uma emulsão, a amostra foi submetida a uma centrifugação a 5000 x g por 2 min. A fase aquosa (fase superior) foi cuidadosamente recolhida e depositada em um novo tubo de microcentrífuga, foi adicionado a esse material acetato de sódio pH 6,0 na concentração final 0,3 M. Após homogeneização, foi acrescido 2-3 volumes de etanol absoluto. O material ficou precipitando por 16 h a -20 °C ou por 20 min em gelo seco. A amostra foi centrifugada por 30 min, 10000 x g, a 4 °C. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, centrifugado novamente por 15 min, 10000 g, a 4 °C. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em água ou TE.

3.12 ANÁLISE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DE TcDLP

3.12.1 Ensaio de hidrólise de GTP

A atividade GTPásica da TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4 foram determinadas utilizando 4 μ M de proteína a 37 °C em tampão HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, KCl 5mM e MgCl₂ 5mM. Foi usado excesso de GTP como substrato (1 mM). A reação foi iniciada adicionando o GTP à mistura. Em diferentes tempos, alíquotas da reação foram diluídas 15 vezes em solução tampão GTPase e rapidamente transferida para o nitrogênio líquido. Os nucleotídeos nas amostras foram separados por fase reversa utilizando a coluna Hyppersil ODS-2 C18 (250 x 4 mm) e o tampão de corrida brometo de tetrabutilamônio 10mM, fosfato potássico 100mM (pH 6,5) e acetonitrilo 7,5%. As proteínas desnaturas foram absorvidas pela coluna guarda monolítica C18. Os nucleotídeos foram detectados por absorção a 254 nm e quantificados por integração dos

picos correspondentes. As taxas de hidrólise foram obtidas a partir de um ajuste linear utilizando a reação inicial (~40% GTP hidrolisado).

3.12.2 Ensaio de co-sedimentação de lipossomos

Para este ensaio foram utilizados lipossomos derivados de extrato de cérebro bovino Folch I (Sigma Aldrich) conforme descrito no item seguinte. Amostras de lipossomos (1 mg/mL) foram incubadas na presença ou na ausência de 6xHis-TcDLP e TcDLP_{MAGMH391-395AAAAA/ΔL4} (5 μM) a temperatura ambiente por 10 min. As condições utilizadas na reação foram: bicina 20 mM (pH 8,6), NaCl 300mM e MgCl₂ 0,5mM, com ou sem adição de GTP_γS (10 mM), volume final 50 μL. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 200.000g por 10 min a 25 °C. O sobrenadante e o sedimento foram separados. As frações de sobrenadante e sedimento foram analisadas em gel SDS-PAGE.

3.12.2.1 Preparação de lipossomos

Uma ampola de Folch fraction 1 (Sigma Aldrich) foi dissolvido em 1 mL de clorofórmio, para a concentração de 25 mg/mL. Esta solução estoque foi armazenada a -80 °C. Para a preparação de lipossomos, 40 μL da solução estoque foi colocado em um frasco pequeno de vidro e foi adicionado 200 μL da solução clorofórmio/metanol (1 mL de clorofórmio/ 300 μL de metanol). O solvente foi evaporado utilizando argônio até que se formasse um filme homogêneo esbranquiçado no fundo do frasco. Em seguida, foi submetido a dessecação por vácuo por no mínimo 30 min. Os lipídios foram hidratados com 1 mL de tampão bicina 20 mM (pH 8,6), NaCl 300 mM e MgCl₂ 0,5 mM por 5 min a temperatura ambiente, para a concentração final de 10 mg/mL. Os lipídios são formados após forte agitação em vortex, 3 vezes por 5 s.

3.12.3 Ensaio de tubulação de lipossomos

Neste ensaio, His₆-TcDLP (1 mg/mL) foram incubadas a temperatura ambiente

com lipossomos (2 mg/mL) em tampão bicina 20 mM (pH 8,6), NaCl 150 mM e MgCl₂ 0,5mM a temperatura ambiente por 5 min. O volume da reação foi de 25 µL. Depois do tempo de incubação 10 µL da reação foi colocado em grades de cobre revestidos com carbono, coradas com acetato de uranila 2,5% e analisadas por microscópio eletrônico Zeiss EM910.

3.12.4 Medição da massa molecular de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4 por espalhamento de luz

A massa molecular de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4 foi determinada utilizando um sistema acoplado de um detector de índice de refração RALS (espalhamento de luz em ângulo reto) (Malvern) conectado em linha com uma coluna de filtração em gel analítica Superdex 200 10/300. Os dados foram analisados com o software Omnisec. O tampão de corrida continha HEPES 20 mM (pH 7,5), NaCl 300 mM, 2 mM MgCl₂ e 2,5 mM DTT.

3.13 TRANSFEÇÃO DE *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT até a densidade de 2×10^7 células/mL. Os parasitas (1×10^8 células) foram coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 10 min a 4 °C. O sedimento celular foi lavado com PBS estéril e ressuspensionado em um mL de solução de eletroporação. Volumes correspondentes a 0,4 mL da suspensão de células foram transferidos para cubetas de eletroporação estéreis (0,2 cm de GAP) (BioAgency) e pré-resfriadas. Foram adicionados cerca de 20 µg do material a ser transfectado. Foi sempre usado uma cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas que foi utilizada como controle. Após 10 min no gelo, as amostras contidas nas cubetas foram submetidas a 2 pulsos de 450 volts, 500 µF, utilizando o eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad). As amostras foram incubadas por 5 a 10 min a temperatura ambiente, em seguida foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio LIT (suplementado com 10.000 U de penicilina e estreptomicina a 10 µg/ml). As culturas foram então incubadas a 28 °C. Após 24 h de incubação

adicionou-se o antibiótico G418 na concentração de 500 µg/ml. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10) em meio LIT suplementado com G418 a cada 8-10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle.

3.14 EXTRATOS PROTÉICOS DE *T. cruzi*

As proteínas totais foram extraídas da forma epimastigota em fase logarítmica de crescimento. Para isso, 1×10^8 células foram centrifugadas a 7.000 x g por 5 min, à temperatura ambiente, e lavadas duas vezes em PBS seguidos pelos mesmos passos de centrifugação. As células foram homogeneizadas em 75 µL de PBS contendo o inibidor de protease E-64, sobre os quais foram adicionados 25 µL de tampão de amostra de proteínas. As amostras foram fervidas por 5 min e armazenadas a -20 °C.

3.15 OBTENÇÃO DE DNA DE *T. cruzi*

A extração de DNA foi realizada conforme descrito por Medina-Acosta e Cross (1993). Epimastigotas (1×10^7 células) foram coletadas do meio LIT por centrifugação a 7.000 x g por 5 min, lavadas em PBS e suspensas em 350 µl de tampão TELT. Após 5 min de incubação, à temperatura ambiente, foi adicionado à amostra 1 volume de fenol/clorofórmio (1:1) e o material foi centrifugado a 13.000 x g por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Esta etapa foi repetida quantas vezes necessárias até que não houvesse uma interface proteica evidente. Após isso, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e coletado por centrifugação a 13.000 x g por 10 min. O DNA presente no sedimento foi lavado 2 vezes com etanol 70%, seco e em seguida ressuspendido em tampão TE contendo RNaseA a 20 µg/ml.

3.16 CONFIRMAÇÃO DA POPULAÇÃO SIMPLES NOCAUTE (*T. cruzi*^{dlp/^dlp::neo}) POR SOUTHERN BLOT

O DNA genômico (5 µg) de *T. cruzi* Dm28c selvagem e *T. cruzi*^{dlp/^dlp::neo} foi submetido a digestões simples com a enzima de restrição *Pst*I, de acordo com as

especificações do fabricante. Após 16 h, o DNA digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE a 100V. O gel foi corado por brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob a luz ultravioleta (310 nm).

Posteriormente, o gel foi tratado com soluções de depuração por 15 min, de desnaturação por 30 min (2 vezes) e solução de neutralização por 30 min (2 vezes) de acordo com protocolo padrão (Sambrook et al, 1989). O DNA foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond N, Amersham Biosciences) por capilaridade (SAMBROOK et al., 1989), utilizando-se de uma “ponte” de papel 3 MM embebido em SSC 20X. Após a transferência o DNA foi fixado à membrana por exposição à luz ultravioleta com uma dose de 120 mJ/cm², usando o aparelho Spectrolinker (Spectronics corp, USA). A membrana contendo o DNA de *T. cruzi* foi pré-hibridizada em solução de hibridização de DNA por 1 h a 65 °C, seguido da adição da sonda marcada radioativamente com α -[P³²]-dCTP (10 µCi/µL; 3.000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences), preparada segundo método de nick translation, descrito por Rigby et al. (1977), utilizando-se o Nick Translation Kit (Amersham Biosciences). Neste trabalho foram utilizadas 2 sondas (tcdlp e npt - neomicina). Após a marcação, as sonda foram purificadas em colunas de Sephadex G-50 (ProbeQuant - Amersham Biosciences) e adicionadas ao tampão de hibridização na concentração de 5 x 10⁶ cpm/ml. As membranas foram incubadas por 16 h a 65 °C e, em seguida, lavadas nesta temperatura duas vezes por 30 min com soluções de alta, média e baixa estringência. As membranas foram expostas a filme de raio-X (Hyperfilm®) na presença de tela intensificadora (Dupont Cronex Lightning Plus), por 7 dias a -70 °C.

3.17 CURVA DE CRESCIMENTO DE *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* clone Dm28c e dos mutantes de *T. cruzi* para TcDLP foram cultivadas como descrito no item 3.4.1 por oito dias. Foram inoculadas 1 x 10⁶ epimastigotas por mL de meio LIT em garrafas de 25 cm³ e incubadas em seguida a 28 °C. Diariamente foi realizada a contagem das culturas, em diluições apropriadas até o oitavo dia. As curvas de crescimento foram obtidas utilizando o programa GraphPad Prism.

3.18 OBTENÇÃO DE ANTISORO POLICLONAL CONTRA TcDLP

A proteína recombinante purificada GST-TcDLP foi inoculada em camundongos da linhagem SWISS, por via intraperitoneal, com 4 aplicações de aproximadamente 20-50µg de antígeno em intervalos de 15 dias, seguida de obtenção do soro após 1 semana da última inoculação. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund, na primeira inoculação e com adjuvante a base de hidróxido de alumínio (Alu-Gel, Serva) nas inoculações posteriores.

3.19 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *Tcdlp* E SEUS MUTANTES POR ENSAIO TIPO *WESTERN BLOT*

Este procedimento foi executado segundo o método de Towbin e colaboradores (1979). Alíquotas de extratos de *T. cruzi* equivalentes a 5×10^6 células foram submetidos à SDS-PAGE. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences), em tampão de western por 2 h, a 60 V ou 20 V por 16 h. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S e descorado suavemente com água bidestilada para a identificação das bandas do marcador de massa molecular. A membrana foi então incubada em solução de bloqueio por 30 min sob agitação suave e, em seguida, incubada com os antisoros anti-TcDLP (1:250), anti-GAPDH (1:500), anti-Flag (1:1500) ou anti-Flag (1:1500) em solução de bloqueio, por 1 h à temperatura ambiente sob agitação. Após a remoção do antisoro, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-tween 20 0,1% por 5 min. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:7500) (Amersham Biosciences) ou fosfatase alcalina (1:10000) (Invitrogen) por 1 h à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada com PBS-tween 20 0,1% por 5 min. O procedimento de lavagem foi repetido mais 2 vezes.

O produto da reação enzimática foi detectado por quimioluminescência, usando o kit ECL “western blotting” (Amersham Biosciences) de acordo com as normas do Fabricante ou utilizando a dupla de cromógeno (NBT) e substrato (BCIP) diluídos em tampão para a fosfatase alcalina, de acordo com a recomendação do fabricante

(Promega).

3.20 IMUNOLOCALIZAÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

Para os ensaios de imunofluorescência, os parasitas foram coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 1 min, lavados em PBS pH 7,2, ressuspensos em paraformaldeído a 4% e aderidos por 20 min a lamínulas recobertas com poli-L-lisina 0,1%. O material foi então incubado com Triton X-100 0,1% diluído em PBS por 5 min a temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS, incubadas em solução de bloqueio para imunofluorescência por 1 h e em seguida incubadas por 1 h com o antisoro correspondente diluído 1:150 em solução de bloqueio para imunofluorescência a temperatura ambiente. Posteriormente as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas por 45 min com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488, diluído 1:600 em solução de bloqueio para imunofluorescência. Após este tempo, as lamínulas foram incubadas por 5 min com o corante de DNA Hoechst 33342 diluído em PBS, lavadas em PBS e por último em água. As lâminas foram montadas com ProLong Gold Antifade (Invitrogen) sobre uma lâmina de microscopia ótica. O material foi observado nos microscópios Leica SP5 e DMI6000.

3.21 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DOS PARASITAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

A coloração dos parasitas foi realizada pelo método Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) modificado. Os parasitas de interesse foram coletados por centrifugação de 1 min a $7.000 \times g$, lavados em PBS para remoção do meio de cultivo e ressuspensos em PBS. Desta suspensão uma alíquota foi retirada e depositada sobre lâminas previamente limpas. Quando secas as lâminas foram imersas, individualmente, na Solução 1 (Fixador), Solução 2 (Revelador) e Solução 3 (Corante), em cada uma por 30 s. Após este processo as lâminas foram lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e cobertas com Permount e lamínula. Os parasitas foram visualizados em microscópio Nikon E600.

3.22 ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DOS PARASITAS TRANSFECTANTES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os parasitas foram coletados, lavados com PBS e fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído e tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida, os parasitas foram fixados por 1 h em solução de 1% de tetróxido de Ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio, diluídos em tampão cacodilato 0,1 M. As células foram então desidratadas em solução contendo concentrações crescentes de acetona e incluídas em Epon. Após a obtenção de cortes ultrafinos dos parasitas, os mesmos foram contrastados em acetato de uranila 5% em água e citrato de Chumbo antes de serem observados e fotografados no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL modelo 1200EXII operando a 80 kV (Centro de Microscopia Eletrônica, UFPR).

3.23 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Aproximadamente 1×10^6 células em meio LIT foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 5 min. O sedimento celular foi ressuspenso em 50 μL de PBS, seguido da adição de 50 μL de paraformaldeído 4%. As células ficaram por exatamente 1 min. Em seguida, 1 mL de PBS foi adicionado às amostras. O material foi centrifugado a $7000 \times g$ por 5 min. Por fim, o sedimento foi ressuspenso em 250 μL de PBS e adicionado 250 μL da solução corante e RNaseA 100 $\mu\text{g/mL}$. As suspensões de células foram mantidas em gelo até quantificação por citometria de fluxo. A fluorescência do iodeto de propídeo foi quantificado com o filtro *bandpass* de 610/20 nm no citômetro FACS Arianall (Becton-Dickinson, San Jose, USA). Os parasitas do tipo selvagem foram utilizados para a compensação de sinal do detector. Foram analisados os dados do grupo de células de 610/20 nm de largura \times 610/20nm de área, excluindo assim grumos e debris celulares. O algoritmo de Dean-Jett-Fox de FlowJo foi usado para estimar a percentagem de células nas fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M.

3.24 ENSAIO DE ENDOCITOSE POR CAPTAÇÃO DE TRANSFERRINA

Neste ensaio foram utilizadas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram coletados por centrifugação a $2500 \times g$ por 5 min, lavados em PBS pH 7,2, e incubados por 15 min à 12 °C e então foram adicionados 20 µg de transferrina acoplada à Alexa 633 e novamente incubados à 12°C por 30 min. Os parasitas foram então fixados em paraformaldeído a 4% (também à 12°C) e aderidos por 20 min a lâminas recobertas com poli-L-lisina a 0,1%. O material foi então incubado com Triton X-100 a 0,5% diluído em PBS por 5 min a temperatura ambiente. As laminae foram novamente lavadas com PBS, incubadas em PBS + BSA 1,5% por 1 h e em seguida incubadas por 1 h com os antissoros anti-TcDLP (1:90), e os anticorpos monoclonais anti-Flag (1:700) e anti-HA (1:700) diluídos em solução de PBS + BSA 1,5%. Posteriormente as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 1 h com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488, diluído 1:600 em solução de PBS + BSA 1,5%. Após este tempo, as laminae foram incubadas por 5 min com o corante de DNA Hoechst 33342 diluído em PBS, lavadas em PBS e montadas com ProLong Gold Antifade (Invitrogen) sobre uma lâmina de microscopia ótica. O material foi observado no microscópio Leica DMI6000.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO *in silico* DA TcDLP

A análise do genoma do *T. cruzi* usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a partir do repositório de sequências de DNA desse protozoário (disponível em www.genedb.org), permitiu a identificação de um gene (gene ID: Tc00.1047053508153.20) com uma fase de leitura de 1962 pares de bases (pb) (www.genedb.org), que codifica uma proteína (denominada de TcDLP) de 72,8 kDa, ortóloga à dinamina de mamíferos. Essa análise não identificou outras proteínas similares à dinamina de mamíferos, sugerindo que a TcDLP seja a única dinamina codificada no genoma do parasita em estudo.

O primeiro passo na caracterização dessa proteína foi fazer algumas comparações com membros já caracterizados da superfamília das dinaminas.

Primeiramente, então, temos o alinhamento da TcDLP com a Dinamina 1 de humanos. hsDinamina 1 já é uma proteína muito bem caracterizada e sua estrutura cristalográfica foi recentemente resolvida (FAELBER *et al.*, 2011) (FIGURA 21).


```

1  -----MNLIAV VNELHDAFANVKMNIKLNLPQIAVVGSSQSSGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVTRCPLV
2  MGNRGMEDLLIPLVNRLQDAFSALGQNADLLDPQIAVVGGSAGKSSVLENFVGRDFLPRGSGIVTRRPLV

1  LQLVQLPKTSEEEWGEFLHKPNKKYFDLEINEEIKHRTVEIAG-NSAISERPINLKVYSKNVLNLTlVD
2  LQLVN-----ATTEYAEFLHCKGKKFTDFEEVRLIEAETDRVTGNTKGISPVVPINLRVYSPHVLNLTlVD

1  LPGLVMNAVVDQPKDIDRQIKEMVTRYVAPVNTIILAI SPANTDLATSSSLRIAKQIDPEGIRTVGVlTK
2  LPGMTKVPFVGDQPPDIEFQIRDMIMQFVTKENCLILAV SPANSDLANSDALKVAVEVDPOGQRTIGVlTK

1  LDLMDRGTDALDALTGKLVSLRHGFVGVVNRSQODINDSKGMLAAREDERAFFHNHPSYSAIADRQGT EY
2  LDLMDEGTDARDVLENKLLPLRRGYIGVVNRSQKDIDGKKDITAAALAAERKFFLSHPSYRHlADRMGTPY

1  LAKKLNQQLLLOHIKDVIPELKKHVDKLLGSTMKQMEKLGMLDQTN-IDPSAHMLSLIKRFSDTLNHtIDG
2  LQKVLNQQLTNHlRDTLPGLRNKLQSQLLSIEKEVEEYKNERPDDPARKTKALLQMVQQFAVDfEKRIEG

1  -GATDATKELMGGARLDYIFNECF AAYVNGLTAKKELTDEYIRINARNMAGMHSALFPSDQVEFVALSRQQ
2  SGDQIDTYELSGGARINRlFHERFPFELVKMEFDEKELRREISYAICKNIHGIRTGLETPDLAF EATVKKQ

1  IARLEEPSQKCVQVFVEELIKIVDICASKLDNFPRLKQAVVDICRQSLQEYRAPTMSHVRTIIAAERGFV
2  VQKLKEPSIKCVDVVSSELTATIRKCSEKLQOYPRLREEMERTVTTHIREREGRTKEQVMILLIDIElAYM

1  NVKHPMEQLVQRSFLKIFGTENEKS-----QTSHSQGGNE-----GKDK
2  NTNHEDEHGFANAQQRSNQMNKKKTSGNQDEILVIRKGWLTINNIGIMKGGSKKEYWFVLTAENLSWYKDD

1  GKK-----VNSEP-----TSNGVE
2  EEKEKKYMLSVDNLKLRDVEKGFMSSKHIFALFNTEQRNVYKDYRQLELACETQEEVD SWKASFLRAGVY

1  KSDMGDVPVTIMLGNN-----MSMHEQHINNVIRDMVEGYFGIVKGTVADQVPKAITLLMITKLRED
2  PERVGDKEKASETEENGSDSFMHSMDFQLERQVETIRNLVDSYMAIVNKTVRDLMPKTIMHLMINNTKEF

1  VYSRLVRSLYSEKKADLLAEPPPEVETQRKATKTMIALKKAQEALSVREFTL-----
2  IFSELLANLYSCGDQNTLMEESSAEQAQRREMLRMYHALKEALSIIIGDINTTTVSTPMPPPVDDSWLQVQ

1  -----
2  SVPAGRRSPTSSPTPQRRAPAVPPPARPGSRGPAPGPPPPAGSALGGAPPVPSRPGASPD PFGPPPQVPSRP

1  ----- 653
2  NRAPPGVPSRSGQASPSRPESPRPPFDL 864

```

FIGURA 21 – ALINHAMENTO DAS PROTEÍNAS TcDLP E DINAMINA 1 HUMANA. A linha identificada como 1 representa a sequência aminioacídica de TcDLP e a identificada com o número 2, a hsDinamina1. Os resíduos de aminoácidos destacados em amarelo são aminoácidos idênticos e os destacados em verde são aminoácidos com características conservadas.

De acordo com a ferramenta SIAS (*Sequences Identities and Similarities* - <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>), essas proteínas possuem 30,87% de identidade e 40,2% de similaridade. No entanto, quando se faz o alinhamento da estrutura secundária dessas duas proteínas, percebemos que elas são bastante semelhantes (FIGURA 22).

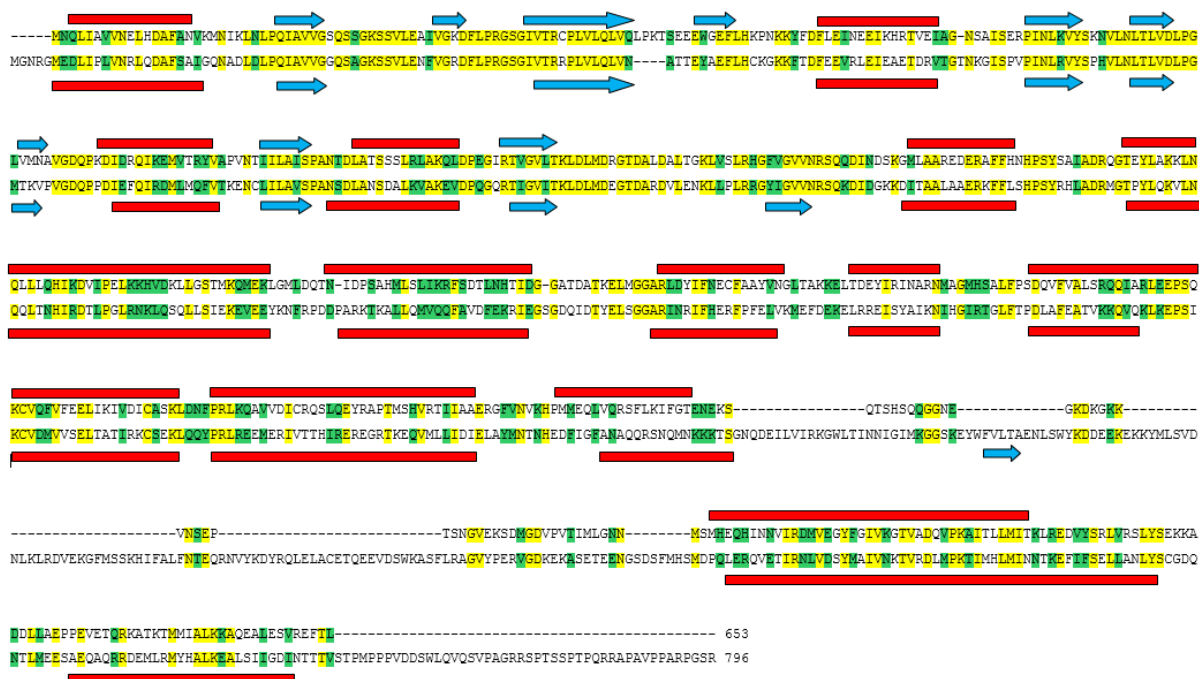


FIGURA 22 – ALINHAMENTO DAS ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DAS PROTEÍNAS TcDLP E DINAMINA 1 HUMANA. A primeira sequência se refere à TcDLP e a sequência abaixo se refere a hsDinamina 1. Os retângulos em vermelho representam estruturas em α -hélice e as setas azuis, estruturas em folhas β .

Com esse resultado podemos inferir que a TcDLP compartilha características e, possivelmente, funções homólogas à dinamina em humanos.

Como acontece com as dinaminas clássicas, TcDLP apresenta um domínio GTPase, um domínio central e um domínio efetor da GTPase (GED). No entanto, não possui o domínio PH, que liga a dinamina aos lipídeos e também não apresenta o domínio PRD (FIGURA 23).



FIGURA 23 – ESQUEMA REPRESENTANDO A ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS DA TcDLP. A forma geométrica a em laranja representa a localização do domínio GTPase ou domínio G; a forma em verde representa o domínio central e em azul, o domínio efetor da GTPase (GED). Esta representação foi criada utilizando a ferramenta MyDomains – PROSITE.

Os domínios G da TcDLP e da hsDinamina 1 possuem uma identidade de 51,45%

e uma similaridade de 63,59%. Sendo este domínio o a mais conservado entre os membros dessa família de proteínas.

Quando se faz o alinhamento de diversos membros da superfamília das dinaminas, utilizando os motivos do domínio G que são importantes para a atividade GTPásica da TcDLP, percebemos que a proteína TcDLP possui os resíduos de aminoácidos críticos conservados. Isso nos leva a acreditar que essa proteína conserva uma das principais características dessa família de proteínas que é capacidade de hidrolisar GTP (FIGURA 24).

	G1 (P-loop)	G2 + switch I	G3 + switchII	G4
TcDLP	IADV GS QSS GKS SVLEAIVG	SGIV T RCPLV	LV D LPG L VMN	VL T K LDL
TbDLP	IADV GS Q SAGKS SVLEAIVG	SGIV T RCPLV	LV D LPG L VMN	VL T K LDL
LmDLP	IADV GS Q SCGKS SVLESIVG	SGIV T RCPLV	LV D LPG L VMN	VL T K IDL
Ras	LVVV GAGGVGKS ALTIQLIQ	EYDP T IEDSY	IL D TA G QEEY	VG N KCDL
Dinamina1	IADV GG Q SAGKS SVLENFVG	SGIV T RRPLV	LV D LPG M TKV	VIT K LDL
DLP1	IVVV GT QSS GKS SVLESLVG	TGIV T RRPLI	LV D LPG M TKV	VIT K LDL
MxA	IAVIGDQSS GKS SVLEALSG	SGIV T RCPLV	LI D LPG I TRV	IL T KPDL
OPA1	VVVV GD Q SAGKT SVLEMIAQ	GEM M T RSPVK	LV D LPG V INT	VL T KVDL
Mitofusina1	VAFF G RTSS GKS SVINAMLW	IGHI T NCFLS	LV D SP G TDVT	LNNR W DA
hGBP1	VAIV G LYRT GKS YLMNKLAG	VQSH T YGIWM	LL D TE G LGDV	VW T LRDF
BDLP	LLVL G DMKR GKS TFLNALIG	VNPCTAVLTV	IV D SP G LNDT	LV N AWDQ
DynA D1	IAFT G HYS GKS SLNCLLM	SPI P T SANLV	YID T P G IDST	IV N QIDR
DynA D2	LALF G GFSS GKS SFANALVG	PTPT T ATINK	IV D TP G ASSM	IIN A ADL
Consenso	GxxxxGKS T	T	DxxG	NKxD TRxD

FIGURA 24 – ALINHAMENTO DE DOMÍNIOS GTPASE MOSTRANDO OS QUATRO MOTIVOS CONSERVADOS. Os resíduos de aminoácidos críticos estão destacados em azul. TcDLP (*Trypanosoma cruzi*), TbDLP (*Trypanosoma cruzi*), LmDLP (*Leishmania major*), Ras (*Homo sapiens*), Dinamina1 (*Homo sapiens*), DLP1 (*Arabidopsis thaliana*), MxA (*Homo sapiens*), OPA1 (*Drosophila melanogaster*), Mitofusina1 (*Homo sapiens*), hGBP1 (*Homo sapiens*), BDLP (*Nostoc punctiforme*), DynA (*Bacillus subtilis*).

FONTE: modificado de Bramkamp (2012).

Pelo alinhamento acima percebemos que as DLPs de outros organismos patogênicos da família Trypanosomatidae (*Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*) também possuem os aminoácidos críticos importantes para a atividade GTPásica conservados.

Segundo Chanez *et al.* (2006), TbDLP é o único membro da superfamília das dinaminas presente no protozoário *Trypanosoma brucei*. O mesmo acontece para os parasitas *L. major* e *Trypanosoma vivax*, indicando que as características dessa proteína são conservadas entre os tripanosomatídeos (MORGAN *et al.*, 2004).

A figura 25 abaixo mostra o alinhamento da dinamina dos tripanosomatídeos das espécies *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*.

TcDLP	MNQLIAVNEELHDAFANVKMNIKNLNPQIAVVGSSGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVT	60
TbDLP	MERLISVVNDLHDAFANVKMNIKNLNPQIAVVGSSAGKSSVLEAIVGKDFLPRGSGIVT	60
LmDLP	MNQLISVINELHDAFAGVKMNIKNLNPQIAVVGSSCGKSSVLESIVGKDFLPRGSGIVT	60
TcDLP	RCPLVLQVLQPKTSEEWEWGEFLHKPNKKYFDLEINEEIKHRTVEIAGNSAITSERPINL	120
TbDLP	RCPLVLQVLQPRSNKDEWGEFLHRPNKKFDFSEINEEIQNRTEVAGHSAITDKPINL	120
LmDLP	RCPLVLQVLQPKSNEEWEWGEFLHIPNKKFYDENEIQNEITRRTIEIAGPSAITDKPINL	120
TcDLP	KVYSKNVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKEMVTRYVAFVNTIILAI SPANTDLA	180
TbDLP	KTYSSHVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKSMVTRYLSPSNTIILAI SPANADLA	180
LmDLP	KVYSSAVLNLTLDLPLGLVMNAVGDQPKDIDRQIKDMVTRYVLPKNTIILAI SPANTDLA	180
TcDLP	TSSSLRLAKQLDPEGIRTVGVLTKLDLMDRGTDAIDALTGKLVSLRHGFVGVVNRSQQDI	240
TbDLP	TSSSLQIAKQLDPEGERTIAVLTKLDLMDRGTDAYDILTGKVLSLRHGFVGVVNRSQHDI	240
LmDLP	TSQSLRLAKQLDPEGVRTVGVLTKLDLMDKGTDCFDVLQNRVLQLRHGFVGVVCRSQQDI	240
TcDLP	NDSKGMLAAREDERAFFHNHPSYSATADROGTEYLAKKLNQLLQHDKVIPKLLKHVDK	300
TbDLP	NTSKGMQAARDDEKEFFRNHPAYASIA DTQGTEYLTQKLNGLLEHIKMPVPELKSHVDK	300
LmDLP	NDCKSMEDARRSEYEFFANSEPTYSPIAEAGTAYLSKKLNGLLEHIKAVIPDLKHHVDQ	300
TcDLP	LLGSTMKQMEKLGMLDQTNIDPSAHMLS LIKRFSDTLNHTIDGGATDATKELMGGARLDY	360
TbDLP	LLDDTRKQMERLGMREHDRVDPGASMLALIKVFCDAINHTIDGGASDASKELLGGARLDY	360
LmDLP	LMEATKKQMEKLGMFQEDITEPTAQLLYLIKVESDALNQTIDGGITDATKELLGGARLDY	360
TcDLP	IFNECFAAVYVNGLTAKKELTDEYIRINARNMAGMHSALFPSDQVFVALSRQQIARLEEPS	420
TbDLP	IFHECFSTYVNGISAKNDLTDEYIRINARNMAGMHSALFPSDHFVVALAKQQIGRLEDPS	420
LmDLP	IFHECFATYVTSLSATKDLTDYIRINTRNMAGMHATLFPSDQVFVALSKQQINRLEEPC	420
TcDLP	QKCVQFVFEELTKIVDICASKLDNFFRLKQAVVDICRQSLQFYRAPTM SHVRTIIAAERG	480
TbDLP	LKCVQFTYEELTKIIDACSIKLERFPKLKQAVVDICREALNEFRAPTVEHVKTIIAAERG	480
LmDLP	IKCVTFVYEELGKIVEICAGKVDRYPNLKEAVIAICKMFLFDYRLPTSTHVRTIIKAERG	480
TcDLP	FVNVKHPMMEQLVQRSFLKIEG-TENEKSQTSHSQQG-----GNEGKDKGKK	526
TbDLP	FINVKHPLMEDLVQRSFIKIEGGNAQESKEEGGNEND-----KDKGKAKVSK	527
LmDLP	FINVKHPMMDELAQRALSNIYGTTSGESSSPPRNSSGPNASAAGGTQADPKQSGKDIKKD	540
TcDLP	VNS-----EPTSNGVEKSDMGDVPVTIMLGNNMSMHECHINNVIRDMV	569
TbDLP	DKSGK-----GLIESIVSQGEKSNMGAVPSSIKLNEKMSTHEQYINDAVREMV	575
LmDLP	DKRGVRDEKRPEKPKEQGNIDSAISPGNKSEMDNDVPSRIMLGKTMTHMQFMNSAIREMV	600
TcDLP	EGYFGIVKGTVADQVPKAITLLMITKLREDVYSRLVRSLYSEKKADDLLAEPPEVETQRK	629
TbDLP	EGYFAVVKSNVADQVPKAITLLMITKLREDVYARLVKLYSERSVEELLAEPPQIAQORS	635
LmDLP	EGYFSIVKGNVADQVPKAITLLMITRLREEVYARLVSELYSDKTAKALLSEPPGIATQRK	660
TcDLP	ATKTMIALKKAQEALESVREFTL-----	653
TbDLP	ATTAMMTALTAKARTALDSVREFALI-----	660
LmDLP	AAKEMLEALTAKAONALNSVRDYQLTKEPASSMQAGT	696

FIGURA 25 – ALINHAMENTO DAS DLPs DOS ORGANISMOS *Trypanosoma cruzi* (TcDLP), *Trypanosoma brucei* (TbDLP) e *Leishmania major* (LmDLP).

A tabela 2 abaixo representa a matriz do percentual de identidade obtida pelo alinhamento anterior.

	TcDLP	TbDLP	LmDLP
TcDLP	100	73,20	71,06
TbDLP	73,20	100	68,33
LmDLP	71,06	68,33	100

TABELA 1 – PERCENTUAL DE IDENTIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS TcDLP, TbDLP, LmDLP. Os valores foram obtidos pelo alinhamento utilizando a ferramenta Clustal2.1.

4.2 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcDLP

As análises de localização e expressão da TcDLP no *T. cruzi* foram feitas a partir da produção de antisoro policlonal anti-TcDLP em camundongos. Para tanto, usou-se a proteína recombinante GST-TcDLP expressa em *E. coli*, a partir da inserção do gene *Tcdlp* no plasmídeo de expressão pGEX-4T1. Essa proteína quimera (aprox. 100 kDa), no entanto, foi produzida de forma insolúvel (forma agregada em corpúsculos de inclusão) em *E. coli* e foi purificada em SDS-PAGE preparativa, a partir da obtenção dos corpúsculos de inclusão. A FIGURA 26 mostra a proteína recombinante purificada em gel de poliacrilamida.

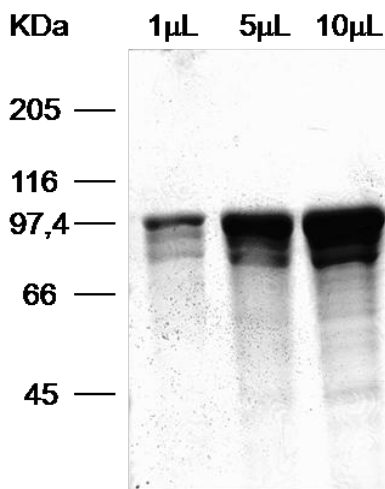


FIGURA 26 – PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GST-TcDLP. A purificação foi feita por lavagem de corpúsculo de inclusão e SDS-PAGE preparativa. Foram aplicados diferentes volumes do material eluído (indicados na figura) para análise em gel de poliacrilamida 10%.

O rastro que se vê abaixo da banda esperada é muito provavelmente degradação proteica, já que a metodologia aplicada na purificação tem bastante passos de lavagens

com tampões, para os quais não foram adicionados inibidores de proteases. A proteína GST-TcDLP, depois de purificada do gel de poliacrilamida, foi então inoculada em camundongos Swiss conforme descrito na seção 3.18 de Material e Métodos. O antisoro policlonal contra a TcDLP foi então usado para identificar a proteína, por ensaio do tipo *western blot*, a partir do fracionamento de extratos proteicos totais das formas epimastigotas de *T. cruzi* por SDS-PAGE. Como mostrado na figura 27, o antisoro foi capaz de identificar uma proteína com tamanho compatível com aquele esperado para a TcDLP (72,8 kDa).

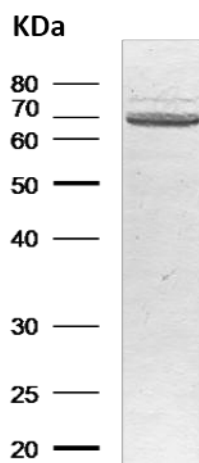


FIGURA 27 – *WESTERN BLOT* UTILIZANDO SORO ANTI-TcDLP E EXTRATO DE PROTEÍNAS DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*. Extrato das formas epimastigotas de *T. cruzi*, equivalente a 5×10^6 parasitas, foi fracionado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) e transferido posteriormente para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com antisoro anti-TcDLP (diluição 1:250), seguida da incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. A detecção da proteína foi obtida com a revelação usando os substratos cromogênicos NBT e BCIP.

O anti-soro foi utilizado para avaliar por *western blot* a expressão da tcDLP durante o ciclo de vida do parasita. Conforme pode ser observado na FIGURA 28, a expressão da TcDLP foi detectada nas principais formas do ciclo de vida do parasita, nos levando a considerar que TcDLP é necessária durante todo o ciclo de vida do *T. cruzi*.

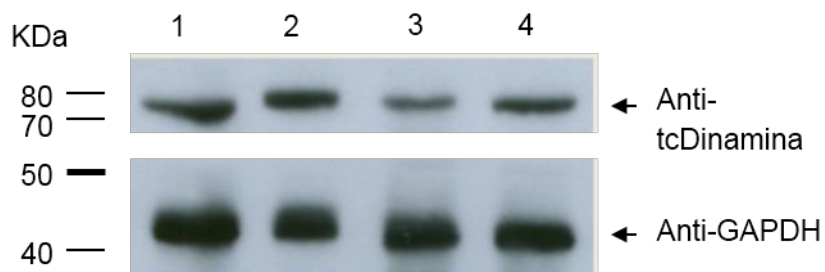


FIGURA 28 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TCDLP NO CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*. Extratos proteicos (equivalentes em quantidade de proteína) das quatro formas características do ciclo de vida do *T. cruzi*: (1) formas epimastigotas, (2) tripomastigotas metacíclicos, (3) amastigotas, e (4) tripomastigotas sanguíneo foram fracionados em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) e transferidos para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com antisoro anti-TcDLP (diluição 1:250), seguida da incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase. A detecção das proteínas foi obtida por revelação por quimioluminescência em filme de raio X (hyperfilm ECL), usando o kit ECL Western Blot (GE). O antisoro anti-GAPDH de *T. cruzi* foi usado como controle.

Ensaio de imunofluorescência foram realizados para localizar a TcDLP nativa em formas epimastigotas e tripomastigotas (FIGURA 29).

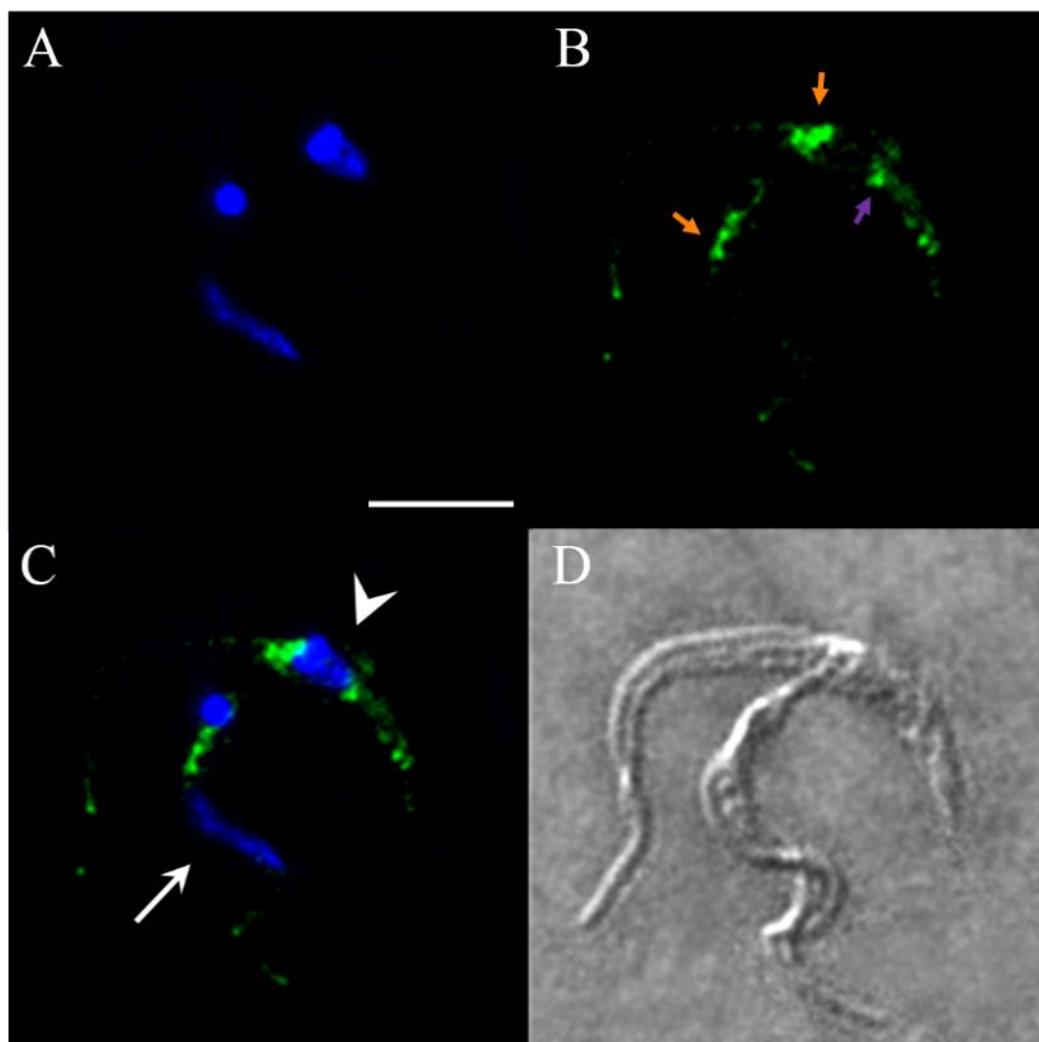


FIGURA 29 – LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE TcDLP NAS FORMAS EPIMASTIGOTA E TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO DE *Trypanosoma cruzi*. As imagens mostram as formas tripomastigota metacíclico (seta branca) e epimastigota (cabeça de seta) de *T. cruzi*. A) marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342. B) Detecção de TcDLP utilizando o anticorpo policlonal anti-TcDLP e um anticorpo secundário anti-mouse acoplado a AlexaFluor 488. C) Sobreposição das imagens de Hoechst e TcDLP. D) Imagem dos parasitas por contraste de fase. As setas laranjas estão indicando a região da bolsa flagelar e a seta roxa, o fundo do complexo citóstoma/citofaringe. Barra = 5 μ m.

Nas formas epimastigotas, TcDLP foi mais abundantemente detectada na região anterior ao cinetoplasto, que corresponde à localização da bolsa flagelar e do complexo de Golgi. É possível observar também uma marcação pontual na região posterior próxima ao núcleo, onde está localizado o fundo do complexo citóstoma/citofaringe, uma invaginação da membrana plasmática que penetra profundamente no citoplasma em direção ao núcleo (DE SOUZA, 2009). Desse modo, a localização da dinamina está de

acordo com a sua associação com duas regiões onde sabidamente ocorre endocitose (vide FIGURA 3).

Nas formas tripomastigotas, a localização se dá majoritariamente entre o núcleo e o cinetoplasto, compatível com a localização, nestas formas, da bolsa flagelar, do complexo de golgi e das organelas do tipo reservossomo-like, ou seja, principalmente nessa região é que possivelmente ocorra um maior tráfego de endomembranas.

A localização predominante da TcDLP nas principais estruturas relacionadas com a endocitose, corrobora com a hipótese de que essa proteínas participa desse processo no *T. cruzi*.

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA DA TcDLP

Com a finalidade de avaliar se TcDLP compartilha características com outros membros da superfamília das dinaminas, foi necessário obtê-la na sua forma funcional para a sua purificação, para em seguida realizar ensaios bioquímicos e biofísicos.

O primeiro ponto que devemos salientar nesse tópico é que TcDLP recombinante é praticamente insolúvel quando expressa em *E. coli*.

Diante do insucesso em obter a proteína nativa solúvel em quantidade suficiente para alguns ensaios, partimos para a expressão de TcDLPs mutantes que fossem solúveis e ao mesmo tempo que mantivessem sua funcionalidade. Para isso foram inseridas mutações sítio-dirigidas no gene *Tcdlp*. As construções gênicas mutadas foram clonadas no vetor pET46EK/LIC. Foram realizadas 3 construções. Na primeira, deletamos a região correspondente à alça 4 (*loop* 4) (Δ L4). Esse *loop* corresponde ao domínio PH nas dinaminas clássicas. Esse domínio, como já citado anteriormente, é responsável pela interação da proteína com membranas. Nossa hipótese foi que, de alguma maneira durante a purificação, a proteína estava sendo sedimentada juntamente com as membranas e outros restos celulares durante a centrifugação, realizada imediatamente após o rompimento celular, com o objetivo de separar a fração solúvel da fração insolúvel. Na segunda construção, geramos a mutação MAGMH391-395AAAAA, em que os resíduos de aminoácidos que ocupam a posição de 391 a 395 foram substituídos por resíduos de alanina. Essa mutação rompe a estrutura quaternária da dinamina deixando-a em um estado que é incapaz de se oligomerizar. A oligomerização

da dinamina é um passo crítico no seu processo de purificação, já que pode formar complexos grandes que precipitam facilmente. A última construção foi a geração de um gene *Tcdlp* mutado contendo concomitante as duas mutações citadas anteriormente (MAGMH391AAAAA/ Δ L4).

Conseguimos a TcDLP solúvel utilizando a construção pET46EK/LIC-Tcdlp MAGMH391AAAAA/ Δ L4. A purificação pode ser observada na figura 30.

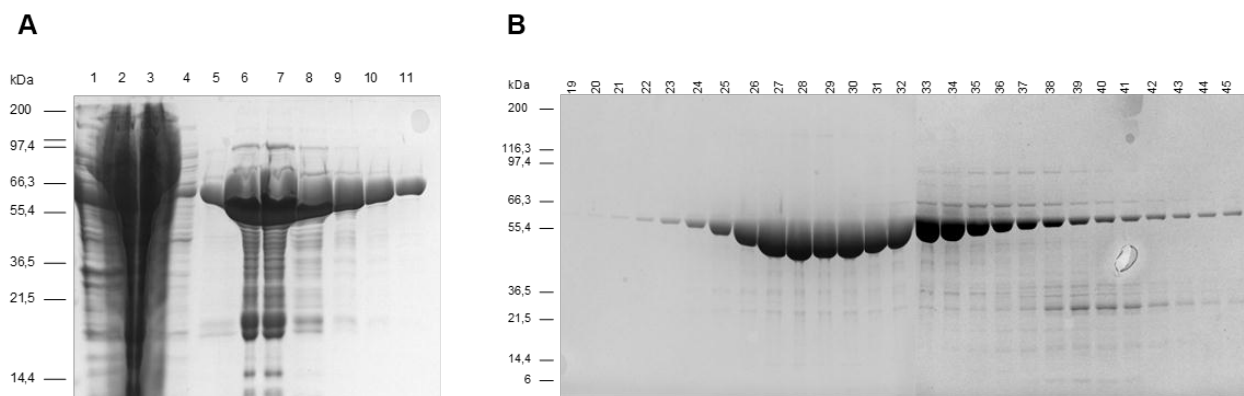


FIGURA 30 – PURIFICAÇÃO DA TcDLP MAGMH391AAAAA/ Δ L4. Purificação da TcDLP por cromatografia de afinidade a metal utilizando a resina Talon® (Clontech) (a) e posterior purificação por filtração em gel utilizando a coluna Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) (b). A) 1 – cultura induzida, 2 - fração total, 3 - fração solúvel, 4 - lavagem, 5 - 1ª eluição, 6 - 2ª eluição, 7 - 3ª eluição, 8 - 4ª eluição, 9 - 5ª eluição, 10 - 6ª eluição, 11 - 7ª eluição. B) Frações de 19 a 45 obtidas na filtração em gel. Cada fração possui 2mL de solução e foi aplicado 15uL no gel de poliácridamida 12%.

As frações 6, 7, 8 e 9 da figura 30A foram usadas para a posterior etapa de purificação. A esse material foi adicionado Mercaptoetanol 2,8 mM e *His*₆-protease que é capaz de clivar uma sequência específica retirando a cauda de 6 resíduos de histidinas fusionada à TcDLP MAGMH391AAAAA/ Δ L4. A amostra ficou digerindo por 16 horas a 4°C. Após diálise para retirar o mercaptoetanol e o imidazol contido no tampão de eluição, o material foi passado novamente pela resina Talon (afinidade por cauda His₆). O material não ligado foi recolhido e submetido a uma segunda etapa de purificação por filtração em gel (Figura 30B). As frações 25 a 31 foram reunidas e concentradas a 20 mg/mL. Uma alíquota da proteína purificada foi utilizada para produção de anticorpos policlonais em camundongos.

Com a proteína purificada em mãos, seguimos com o ensaio para avaliar se a TcDLP mutante era capaz de hidrolisar GTP. No entanto, antes de realizar o ensaio de atividade GTPásica, verificamos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

se a proteína purificada estava ligada a GTP ou GDP endógenos de *E. coli*, o que influenciaria no resultado do ensaio. Nenhuma forma de nucleotídeo foi observado ligado à proteína (dado não mostrado). Diante deste resultado, prosseguimos com o ensaio para avaliar a atividade GTPásica da TcDLPMAGMH391AAAAA/ Δ L4. Para tanto, utilizamos o método por HPLC para acompanhar a hidrólise de GTP em GDP ao longo do período de incubação. O experimento foi realizado em triplicata e, após tratamentos estatísticos, obtivemos que TcDLPMAGMH391AAAAA/ Δ L4 possui atividade GTPásica com um K_{obs} de 19 min^{-1} , significando que cada molécula da proteína é capaz de hidrolisar 19 moléculas de GTP por minuto (GRÁFICO 1).

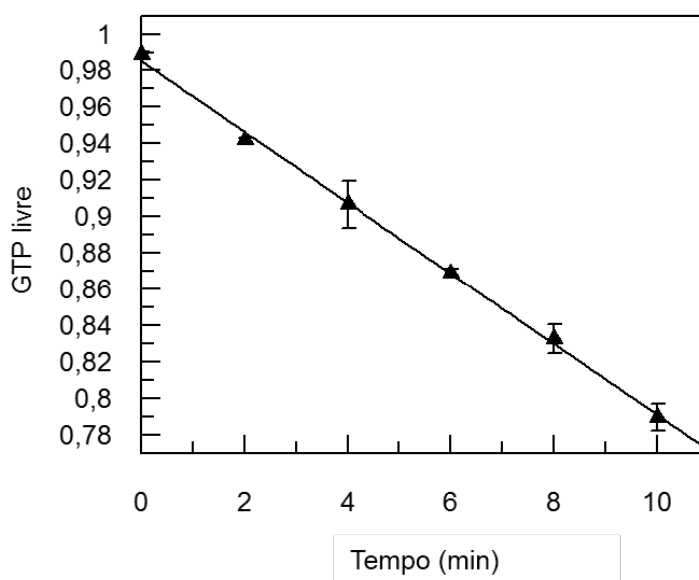


GRÁFICO 1 – ATIVIDADE GTPÁSICA DE TcDLPMAGMH391AAAAA/ Δ L4.

Pudemos realizar esse ensaio de hidrólise de GTP com essa proteína mutada, pois as mutações inseridas não afetam a atividade GTPásica basal da proteína. No entanto, não foi possível verificar se essa atividade é estimulada pela adição de lipossomos. Nesse ensaio espera-se que a oligomerização da proteína na presença de um molde (lipossomos) aumente a capacidade da proteína de hidrolisar GTP. Como já explicado anteriormente, a mutação MAGMH391AAAAA rompe a estrutura quaternária da dinamina, formando dímeros estáveis, como foi comprovado por espalhamento de luz em ângulo reto ou RALS (de *Right Angle Light Scattering*) (FIGURA 31).

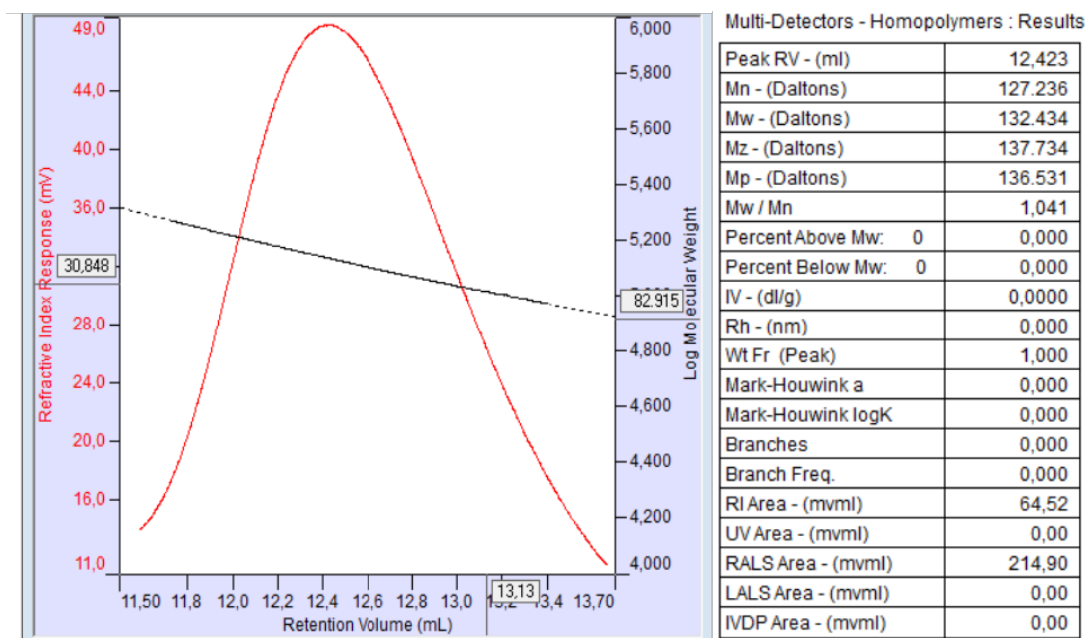


FIGURA 31 – DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE TcDLPMAGMH391AAAAA/ Δ L4 POR ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO.

Deste modo, não é possível verificar a taxa de hidrólise de GTP da TcDLPMAGMH391AAAAA/ Δ L4 oligomerizada.

Esta proteína purificada também foi utilizada para realizar triagem de moléculas inibidoras utilizando uma biblioteca de 30.000 pequenos compostos. Contudo, não foi possível seguir com os ensaios, pois a metodologia utilizada (detecção de fosfato inorgânico usando verde malaquita) se mostrou pouco sensível.

Para realizar os ensaios biofísicos, tais como o ensaio de ligação e a capacidade de tubular lipossomos, precisávamos, portanto, da proteína purificada na sua forma nativa, sem mutações. Após diversas tentativas conseguimos uma quantidade muito pequena, mas suficiente para realizar o ensaio.

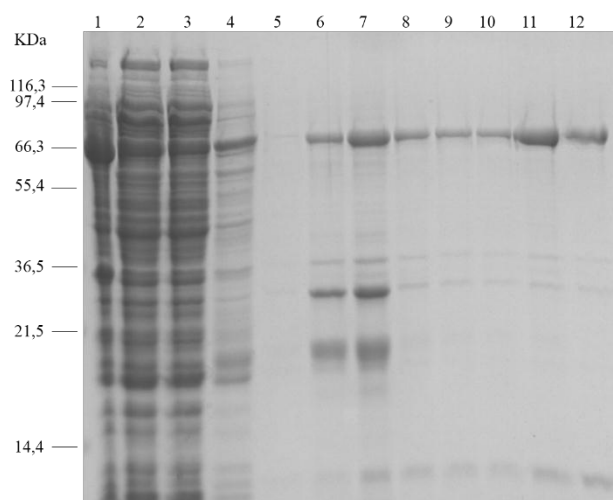


FIGURA 32 – PURIFICAÇÃO DE HIS₆-TcDLP POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE. Purificação da TcDLP por cromatografia de afinidade a metal utilizando a resina Ni-NTA (Qiagen). 1 – cultura induzida, 2 - fração total, 3 - fração solúvel, 4 - lavagem, 5 - 1^a eluição, 6 - 2^a eluição, 7 - 3^a eluição, 7 - 4^a eluição, 9 - 5^a eluição, 10 - 6^a eluição, 11 - 7^a eluição, 12 - 8^a eluição.

Com o ensaio de ligação a lipossomos mostramos que TcDLP é capaz de se ligar a membranas, sendo está uma outra importante característica das proteínas pertencentes à superfamília das dinaminas. O resultado pode observado na figura 33A.

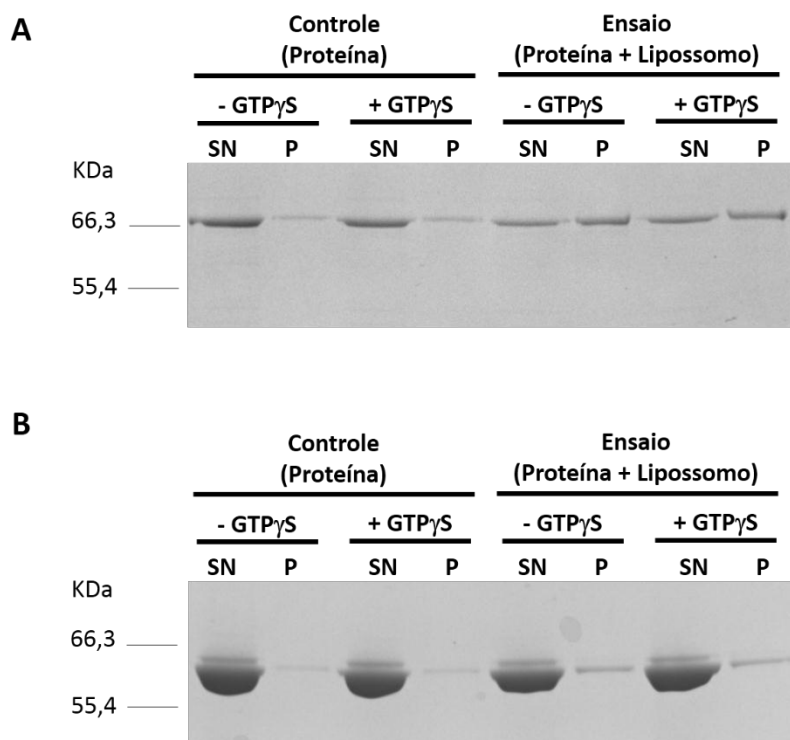


FIGURA 33 – ENSAIO DE COSEDIMENTAÇÃO DE LIPOSSOMOS. A) Ensaio de cosedimentação de lipossomos de His₆-TcDLP. B) Ensaio de cosedimentação de lipossomos de TcDLPMAGMH391AAAAA/ Δ L4. O controle representa o ensaio sem adição de lipossomos. O GTP γ S é um análogo de GTP não hidrolisável. SN – Sobrenadante; P – *pellet* ou sedimento.

Analizando a figura 33A percebemos que a TcDLP sem a adição de lipossomos se encontra majoritariamente no sobrenadante (SN), isso significa que ela se encontra solúvel em solução. No entanto, quando adicionamos lipossomos após centrifugação a proteína passa a ser encontrada também no sedimento (P, *pellet*), significando que a TcDLP foi capaz de se ligar aos lipossomos e ser co-sedimentada após centrifugação. Como já esperado, TcDLPMAGMH391AAAAA/ Δ L4 não foi capaz de co-sedimentar com os lipossomos. Este resultado pode ser explicado por 2 fatores: a mutação MAGMH391AAAAA impede que a proteína forme oligômeros, perdendo então a avidéz por membranas; outra explicação é o fato de o *Loop* 4, teoricamente responsável pela inserção da proteína à camada lipídica, está deletado nesta construção.

O próximo passo foi verificar por microscopia eletrônica se a TcDLP é capaz de tubular lipossomos. A figura 34 exemplifica o ensaio.

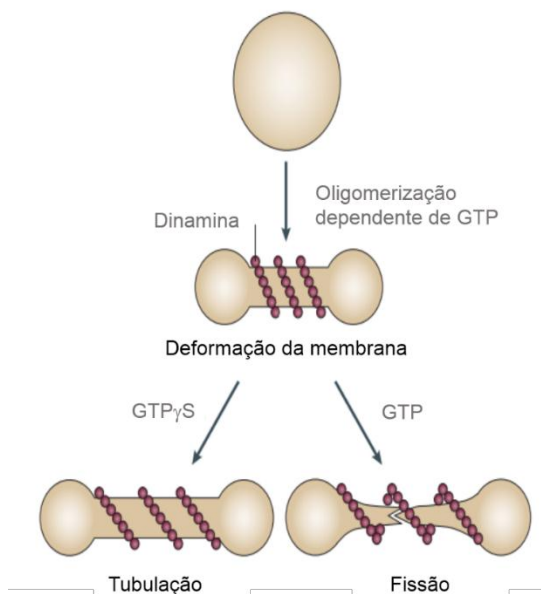


FIGURA 34 - ESQUEMA REPRESENTANDO A LIGAÇÃO DA DINAMINA A UM LIPOSSOMO. Quando se tem a presença de GTP, a dinamina rapidamente consegue fazer a fissão do túbulo (que representa o pescoço formado no brotamento da vesícula). Na presença de $\text{GTP}\gamma\text{S}$, a dinamina hidrolisa esse nucleotídeo mais lentamente e ocorre o que chamamos de tubulação do lipossomo, já que a fissão é retardada ou impedida.

Seguimos então com o ensaio de tubulação de lipossomos. No entanto, não foi possível ver os túbulos estendidos característicos. Uma explicação para tal fato é que mesmo na ausência de GTP a TcDLP seja capaz de fissionar os lipossomos rapidamente.

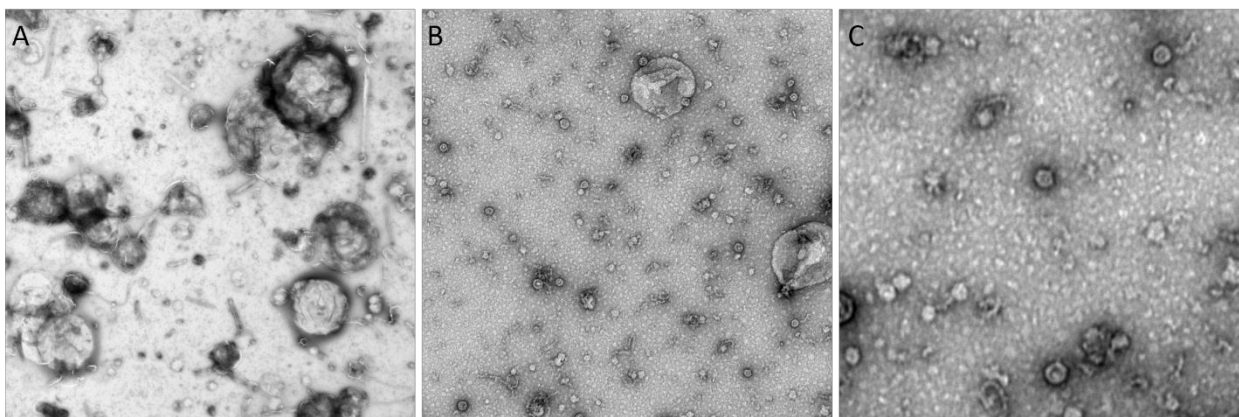


FIGURA 35 – ENSAIO DE TUBULUÇÃO DE LIPOSSOMOS . A) Controle – lipossomos (2 mg/mL); B) Lipossomos + His₆-TcDLP; C) Lipossomos + His₆-TcDLP, anéis de His₆-TcDLP em maior destaque.

No entanto, verificamos que a TcDLP é capaz de formar anéis na ausência de nucleotídeos, como descrito para Dinamina A por Klockow *et al.* (2002).

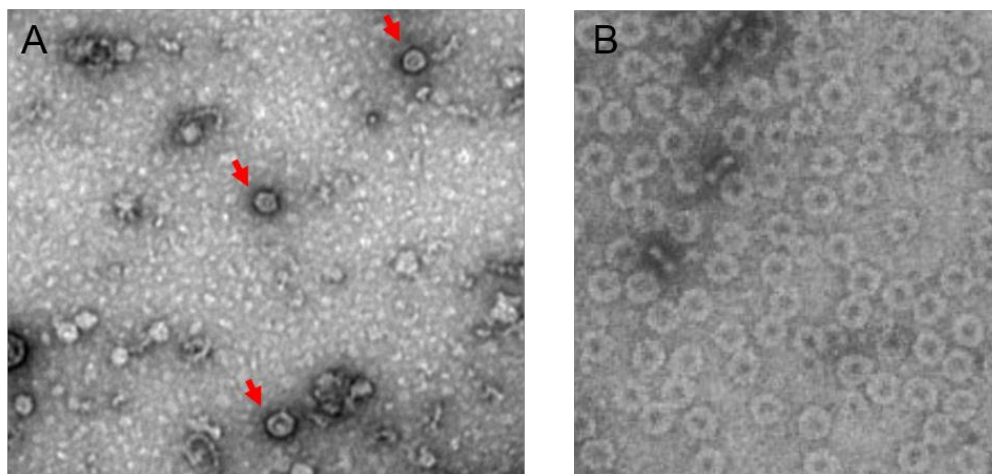


FIGURA 36 – ANÉIS DE DINAMINA. A) Estrutura em anel da TcDLP na ausência de nucleotídeos. B) Estrutura em anel da Dinamina A do organismo *Dictyostelium discoideum* (KLOCKOW, 2002).

4.4 ANÁLISE DA FUNÇÃO DE TcDLP nas formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para caracterizar a função de TcDLP no *T. cruzi* foram realizadas duas estratégias: o nocaute gênico e o efeito dominante negativo.

4.4.1 Nocaute gênico

O silenciamento de genes por nocaute mediado por recombinação homóloga é uma metodologia de genética reversa que vem sendo utilizada para estudar a função de genes em *T. cruzi* (MACRAE *et al.*, 2006).

Com o objetivo de tentar inferir uma função para a TcDLP no *T. cruzi*, nossa primeira idéia foi obter um mutante que não expressasse o gene da dinamina. Com essa estratégia poderíamos analisar os efeitos causados pela ausência da TcDLP no parasita. Utilizamos a seguinte estratégia: clonamos as regiões *upstream* (a montante) e *downstream* (a jusante) do gene *Tcdlp* flanqueando um gene que confere resistência ao antibiótico neomicina (G418), como ilustramos na figura 16 (material e métodos).

Com os oligonucleotídeos iniciadores específicos, amplificamos o cassete UPSneoDOWN (FIGURA 38), que foi usado então para transfectar as formas epimastigotas do clone Dm28c de *T. cruzi*. Essa estratégia permite que pelo menos um

dos alelos do gene de interesse seja substituído, por recombinação gênica, pelo cassete usado na transfecção. Essa população resistente a um antibiótico é geralmente chamada de simples nocaute e representada como *T. cruzi* *dlp/Δdlp::neo*.

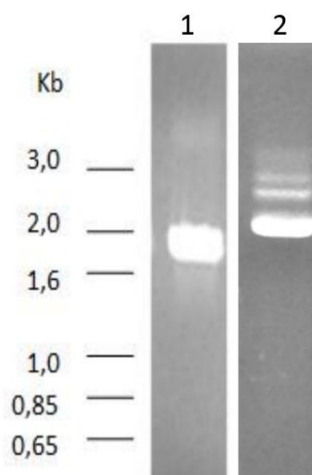


FIGURA 37 – AMPLIFICAÇÃO DOS CASSETES UTILIZADOS NA TRANSFEÇÃO DE *T. cruzi* PARA OBTENÇÃO DA CEPA NOCAUTE. 1) Amplificação do cassete UPSneoDOWN. 2) Amplificação do cassete UPShigroDOWN.

A mesma estratégia foi usada para tentarmos obter o mutante nulo (contendo os dois alelos nocauteados) ou simplesmente nocaute duplo (*T. cruzi* $\Delta dlp::neo/\Delta dlp::higro$). Um segundo gene de resistência (gene *higro*) foi flanqueado pelas regiões *upstream* e *downstream* do gene de interesse. O cassete UPShigroDOWN foi então usado para transfectar o parasita simples nocaute. No entanto, todas as tentativas de se obter inicialmente a cepa simples nocaute, utilizando essa estratégia, foram infrutíferas. Para isso tínhamos duas explicações. A primeira seria que a diminuição da quantidade dessa proteína no parasita (*knockdown*) já seria suficiente para causar alterações celulares que tornariam o parasita mutante inviável. A segunda explicação seria uma falha na estratégia, já que as sequências utilizadas foram retiradas de um banco de dados onde está depositado o genoma do *T. cruzi* clone CL Brener (disponível em www.genedb.org). Contudo, a montagem do genoma do clone CL Brener não pode ser concluída por conter um grande número de sequências repetitivas e famílias multigênicas. Por isso, várias regiões cromossômicas estão representadas como contigs, geradas pelo consenso de fragmentos sequenciados que se sobrepõem. O gene *Tcdlp* está localizado no final de um contig e suspeitamos que uma das regiões flanqueadoras, pela falha na montagem,

não estaria correta. Consequentemente a recombinação não estaria acontecendo. Esta segunda explicação, para nós, era mais plausível.

Tentamos então uma outra estratégia. Nessa nova estratégia utilizamos as regiões codantes N- e C-terminal do gene *Tcdlp*, ao invés das regiões UPS e DOWN, como mostrado na figura a seguir. Outra diferença é que agora os genes de resistência estão flanqueados por regiões intergênicas de genes sabidamente constitutivos.

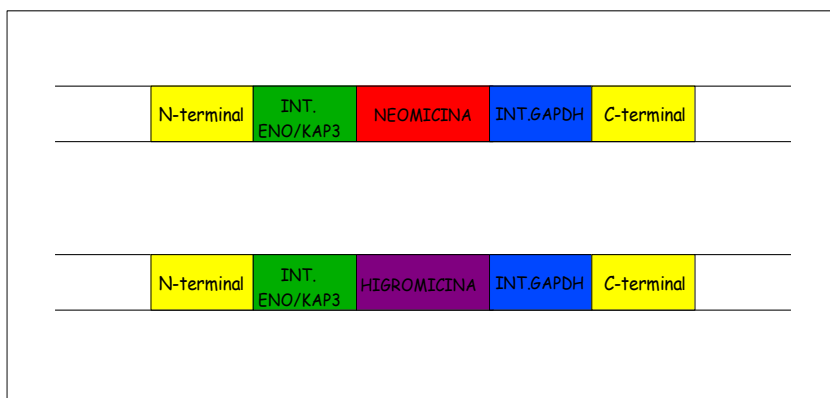


FIGURA 38 – ESQUEMA REPRESENTANDO A SEGUNDA ESTRATÉGIA UTILIZADA NO NOCAUTE GÊNICO DE TcdLP. Utiliza-se dois genes que conferem resistência a dois diferentes antibióticos para se obter o nocaute dos dois alelos, já que o parasita *T. cruzi* é diplóide. A inserção acontece pelo evento de recombinação homóloga das regiões N- (666pb) e C-terminal (639pb). Quando se obtém o duplo nocaute, a cepa de *T. cruzi* obtida é resistente aos antibióticos neomicina e higromicina. INT. – região intergênica.

Com essa estratégia conseguimos o simples nocaute *T. cruzi*^{*tdlp*^Δ*tdlp::neo*} (confirmado por *southern blot*, FIGURA 39), o que significa, de uma maneira mais simplificada, que obtivemos uma cepa onde um alelo foi nocauteado, sendo esta cepa resistente ao antibiótico G418.

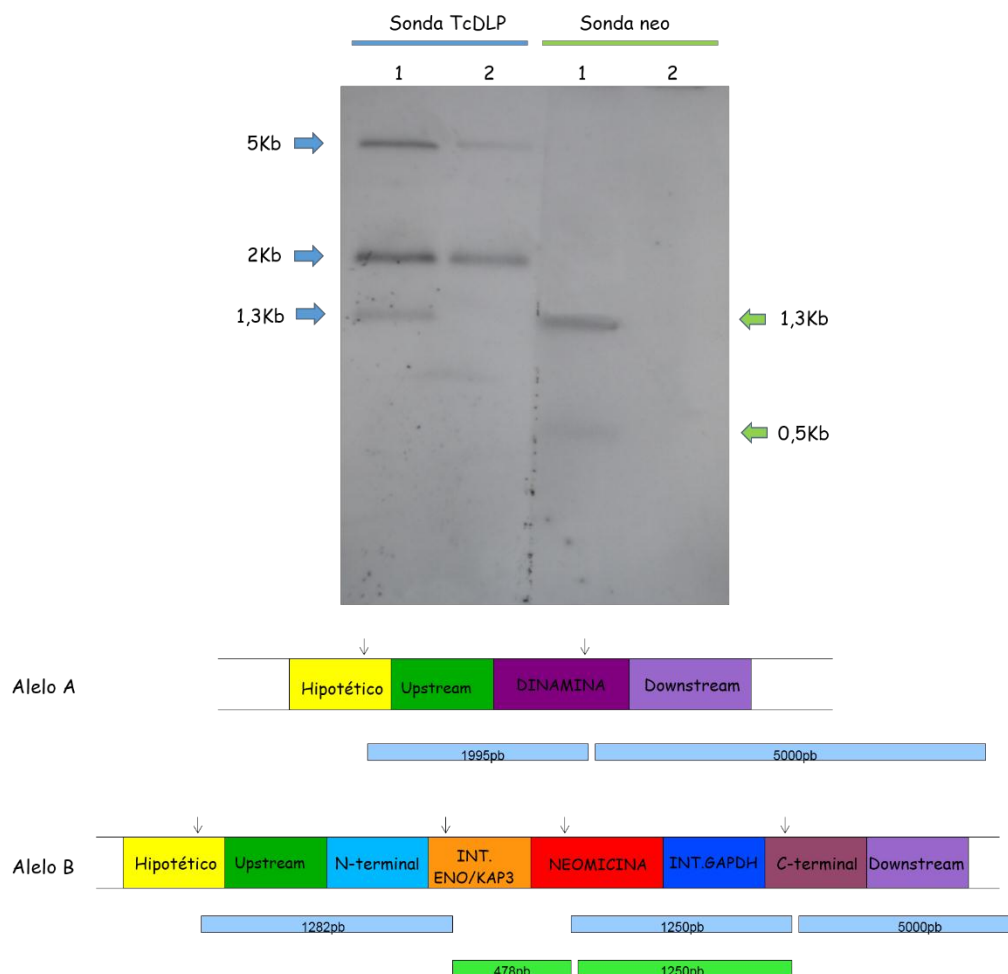


FIGURA 39 – ANÁLISE DO SIMPLES NOCAUTE GÊNICO POR *SOUTHERN BLOT*. A figura acima representa o autoradiograma. A figura abaixo esquematiza os padrões dos fragmentos obtidos da digestão do DNA com a enzima de restrição *Pst*I. Foram utilizadas duas sondas: TcDLP (representada pela barra azul) e neomicina (representada pela barra verde). 1) DNA da cepa simples nocaute *T. cruzi*^{dlp/Δdlp::neo}. 2) DNA *T. cruzi* do tipo selvagem.

A análise por *western blot* mostrou que a quantidade de proteína está diminuída nesta cepa mutante simples nocaute (FIGURA 40). No entanto, os parasitas apresentaram a mesma taxa de crescimento quando comparado com a cepa selvagem *T. cruzi* Dm28c (GRÁFICO 2) e também não verificamos grandes alterações morfológicas utilizando microscopia óptica (FIGURA 41).

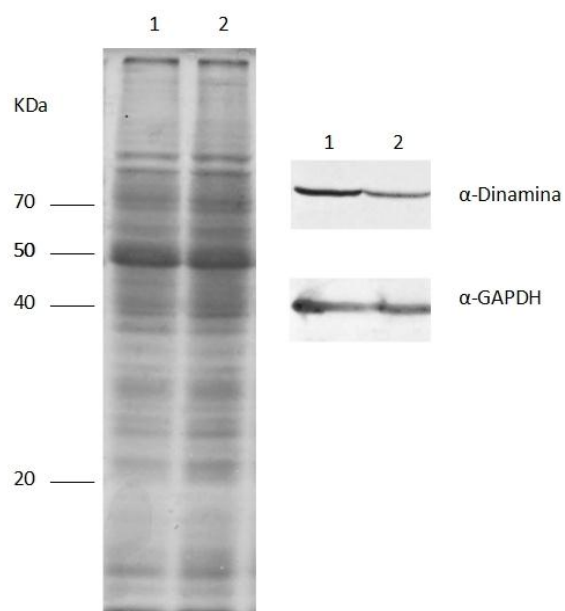


FIGURA 40 – EXPRESSÃO DE TcDLP NA CEPA SIMPLES NOCAUTE. 1) Cepa *T. cruzi* selvagem; 2) Cepa simples nocaute *T. cruzi*^{dlp/Δdlp::neo}. α-GAPDH foi utilizado como controle, bem como o gel SDS-PAGE corado com coomassie blue (controle de carregamento).

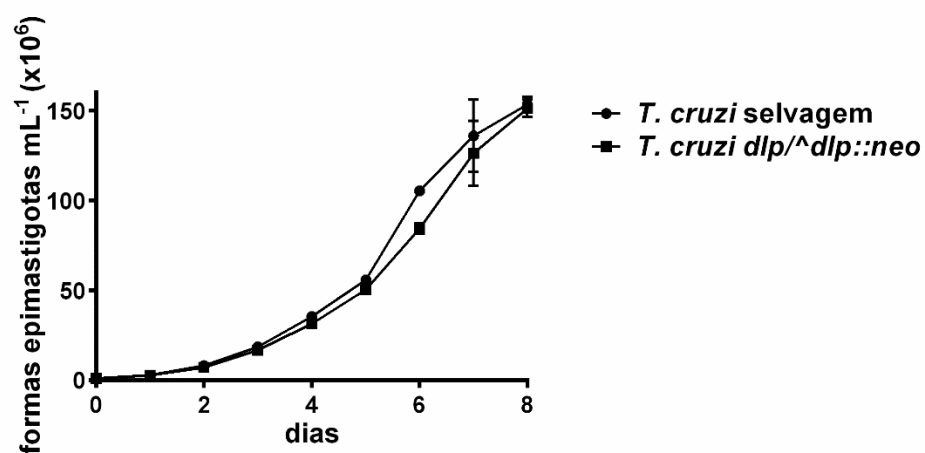


GRÁFICO 2 – PERFIL DA CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA SIMPLES NOCAUTE *T. cruzi*^{dlp/Δdlp::neo}.

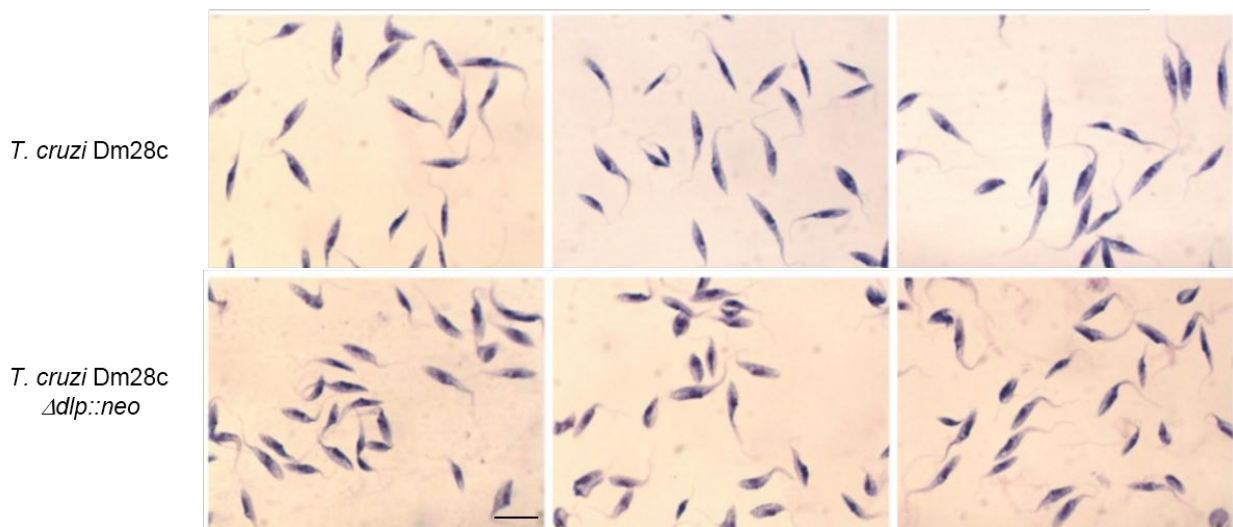


FIGURA 41 - COLORAÇÃO PELO MÉTODO PANÓTICO RÁPIDO DA CEPA SIMPLES NOCAUTE *T. cruzi*^{*dlp*^{-/-}*dlp::neo*}. Barra = 10 μ m.

O mesmo resultado foi observado quando fizemos ensaio de metaciclogênese. Os parasitas mutantes foram capazes de se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos na mesma taxa que o controle (GRÁFICO 3). Isso significa que a diminuição do número de moléculas da proteína TcDLP no *T. cruzi* parece não afetar a diferenciação do parasita. Amostras foram processadas para avaliar se havia alterações ultra-estruturais.

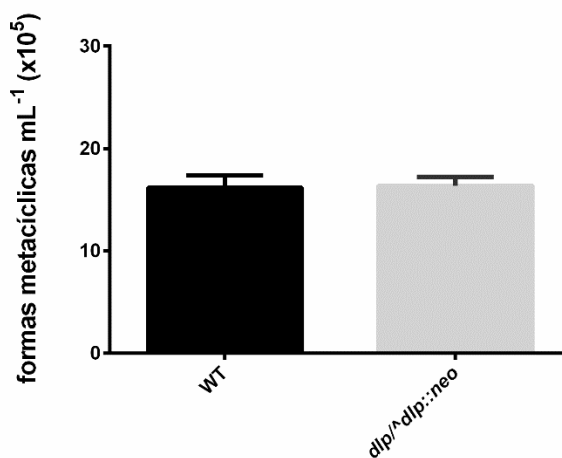


GRÁFICO 3 - METACICLOGÊNESE *IN VITRO* DE *T. cruzi* Dm28C TIPO SELVAGEM E *T. cruzi* SIMPLES NOCAUTE. A coluna em preto (WT) representa o resultado obtido para a cepa *T. cruzi* Dm28c do tipo selvagem. A coluna em cinza representa o resultado obtido para a cepa simples nocaute *T. cruzi*^{*dlp*^{-/-}*dlp::neo*}.

Não foi possível selecionar a população duplo nocaute. Os parasitas simples

nocaute transfectados com o cassete contendo o gene que confere resistência à higromicina, assim como os parasitas selvagens, não são capazes de proliferar na presença do antibiótico higromicina B. Como obtivemos esse resultado mais de uma vez e fomos bem criteriosos na mudança da estratégia, temos um forte indicativo de que TcDLP é essencial para o tripanosomatídeo em estudo e, diante deste fato, poderia ser um possível alvo de drogas no tratamento da doença de Chagas.

Apesar desse resultado se mostrar bastante interessante, a inviabilidade do duplo nocaute não permitiu tirar conclusões sobre as funções da TcDLP e em quais processos essa proteína poderia estar atuando. Assim, seguimos com outras estratégias.

4.4.2 Efeito dominante negativo

O efeito dominante negativo consiste em expressar uma proteína mutada em sítios específicos que afetam sua atividade para que interfira com a atividade da proteína nativa. As alterações causadas por essa expressão são chamados de efeito dominante negativo.

4.4.2.1 Efeito dominante negativo utilizando o sistema DD (Domínio desestabilizador)

Para tentar responder qual a função da TcDLP no *T. cruzi* avaliamos que a construção de um sistema de expressão regulado para se obter o efeito dominante negativo seria bastante oportuno. Para isso, clonamos o gene *Tcdlp* contendo uma mutação específica (substituição do resíduo de lisina da posição 39 por um resíduo de alanina, K39A – FIGURA 42), em fase com a sequência nucleotídica que traduz o domínio DD.



FIGURA 42 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RESÍDUO DE LISINA MUTADO PARA A OBTENÇÃO DA PROTEÍNA MUTANTE TcDLPK39A. As sequências aminoacídicas de TcDLP e Dinamin-1 de humanos estão alinhadas. A caixa marrom delimita o domínio G; a caixa azul ciano, o domínio central; a caixa vermelha, o domínio PH e caixa rosa, o domínio efetor da GTPase (GED). Dentro da elipse preta, destacados em vermelho, temos o resíduo de lisina que foi modificado para alanina.

O domínio DD quando presente na proteína de interesse direciona-a para o proteassomo para ser degradada. Na presença de drogas, tais como Shield1 e rapamicina, a proteína recombinante não sofre degradação e se acumula na célula, permitindo que, no nosso caso, obtenhamos a expressão do efeito dominante negativo.

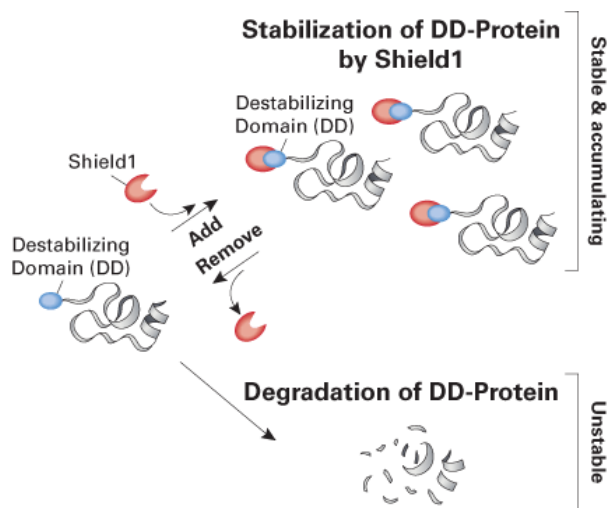


FIGURA 43 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DD. Um pequeno domínio desestabilizador (DD; azul) é fusionado à proteína alvo de interesse. Shield1 (pequena molécula permeável; vermelho) se liga ao DD e o protege da degradação pelo proteossomo. A remoção de Shield1 causa uma rápida degradação da proteína recombinante (DD + proteína de interesse).

Após transfecção e seleção, a análise por western blot mostrou que a proteína recombinante (domínio DD + TcDLPK39A) pode ser identificada no extrato do parasita transfectado (FIGURA 44).

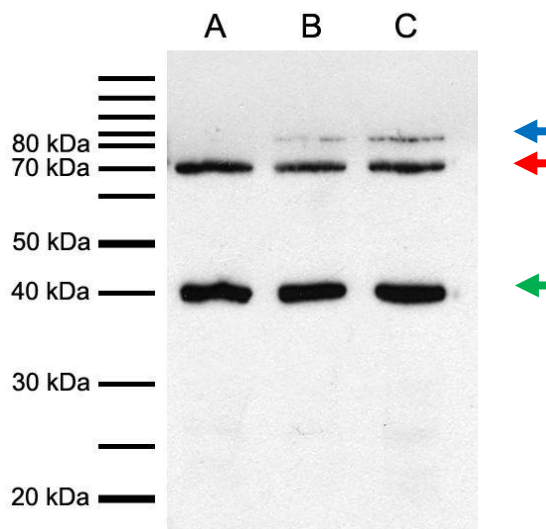


FIGURA 44 – *WESTERN BLOT* REALIZADO PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA FUSÃO DD-TcDLPK39A. (A) Extrato de proteínas de formas epimastigotas (cepa selvagem). (B) Extrato de proteínas de formas epimastigotas expressando de forma episomal DD-TcDLPK39A sem adição de Shield1. (C) Extrato de proteínas de formas epimastigotas expressando de forma episomal DD-TcDLPK39A com adição de Shield1. As membranas foram reagidas com soro anti-TcDLP (setas azul e vermelha) e anti-TcGAPDH (seta verde).

Na coluna A (cepa selvagem) verificamos a presença de duas bandas, a superior

referente à TcDLP (72,8 kDa) e a inferior referente à TcGAPDH, utilizado como controle positivo. Já nas colunas B e C além dessas bandas, percebe-se uma banda superior de aproximadamente 82 kDa. Essa banda corresponde à expressão da fusão DD-DLPK39A, já que o domínio DD possui peso molecular de aproximadamente 10 kDa. Esperávamos que apenas na coluna C houvesse a presença da banda de 82 kDa, já que a droga presente no meio protege a proteína recombinante da degradação proteossomal. Com esse resultado percebemos que nesse sistema ocorre um escape da expressão da proteína mutante que pode inviabilizar a análise do dominante negativo. Além disso, a expressão obtida da proteína mutada também não foi muito satisfatória. Mesmo assim, várias alterações ultraestruturais foram observadas após adição de rapamicina (análogo de Shield1). Como podemos observar nas figuras 45, 46 e 47.

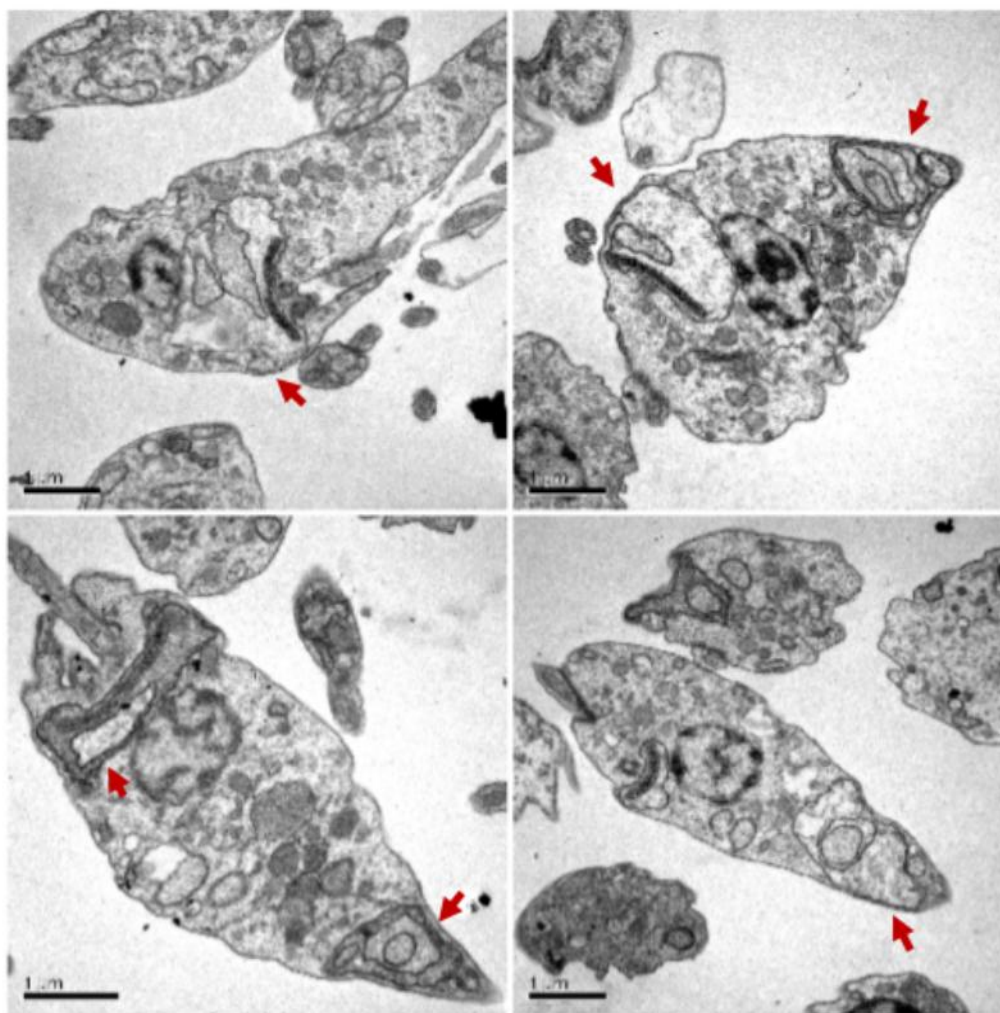


FIGURA 45 – ALTERAÇÃO MITOCONDRIAL CAUSADO PELO EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO *Trypanosoma cruzi*, VISUALIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA. As setas vermelhas indicam a mitocôndria aumentada no parasita. Barra: 0,1μm.

Na figura 45 acima podemos observar alterações na mitocôndria, indicada pelas setas vermelhas. Estas mitocôndrias estão alargadas ou inchadas. Na figura 46, a seguir, podemos comparar a ultraestrutura da mitocôndria de um parasita selvagem.

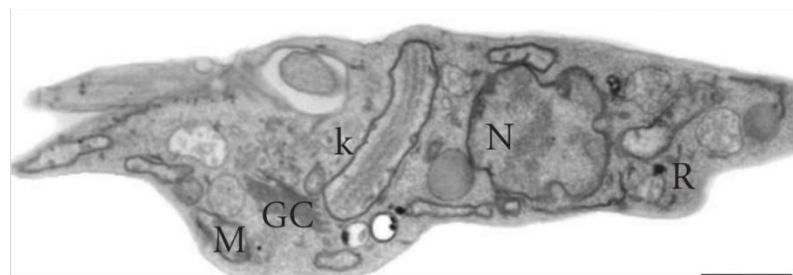


FIGURA 46 – ULTRAESTRUTURA DA FORMA EPIMASTIGOTAS DO *Trypanosoma cruzi*. M – Mitocôndria, GC – Complexo de Golgi, k – Cinetoplasto, N – Núcleo, R – Reservossomo. Barra: 0,5µm. FONTE: Modificado de Salomão et al. (2009).

Este efeito dominante negativo pode ser um indicativo de que TcDLP possa estar atuando na divisão mitocondrial. Também foram observadas alterações no complexo de Golgi (FIGURA 47).

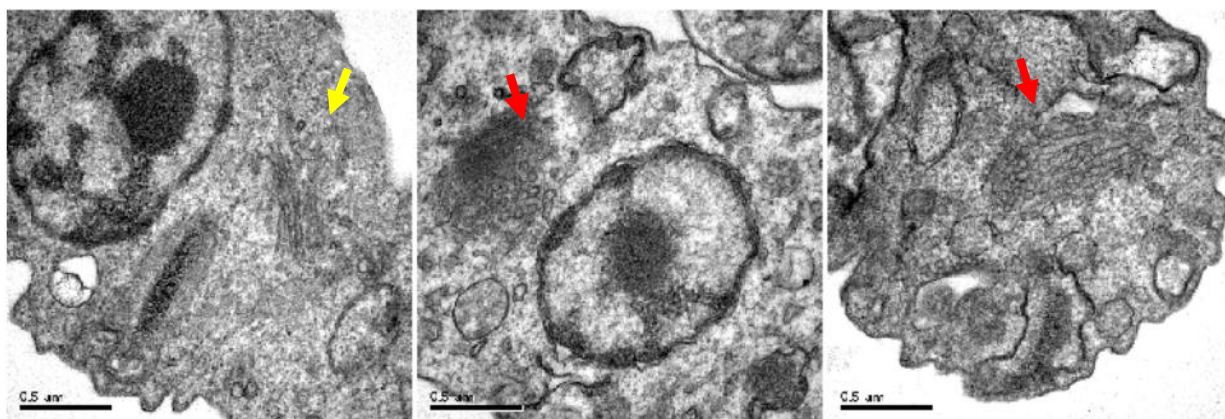


FIGURA 47 – ALTERAÇÃO DO COMPLEXO DE GOLGI CAUSADO PELO EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO PARASITA *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA. A seta em amarelo indica um complexo de Golgi de tamanho e forma inalterado. As setas vermelhas indicam os complexos de Golgi aumentados. Barra: 0,5 µm.

Este resultado sugere que TcDLP participe na liberação de vesículas do complexo de Golgi. Esta estrutura aumentada pode significar que não esteja ocorrendo perfeitamente a liberação de vesículas, fazendo com que o complexo de Golgi aumente de tamanho.

Podemos observar também parasitas com morfologia e citocinese alteradas (FIGURAS 48 e 49).

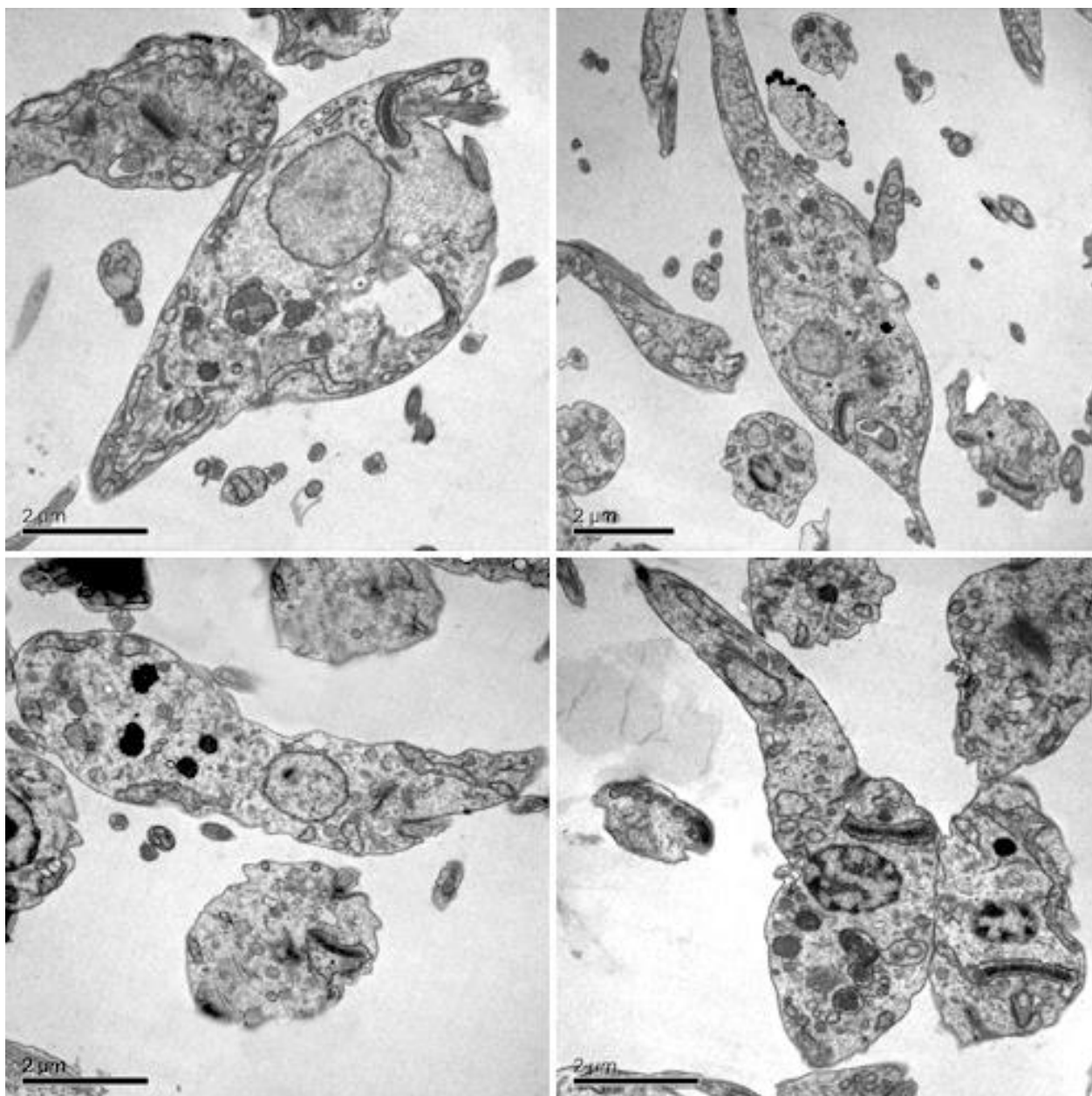


FIGURA 48 - ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA DO PARASITA *Trypanosoma cruzi* CAUSADO PELO EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A VISUALIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA. Barra: 2 µm.

Pela figura 48 acima podemos perceber parasitas grandes e com a forma alterada. Na figura a seguir (FIGURA 49) observamos parasitas com os mais variados fenótipos quanto a presença de núcleo (N) e cinetoplasto (K), por exemplo, 2N0K, 0N2K, 2N1K.

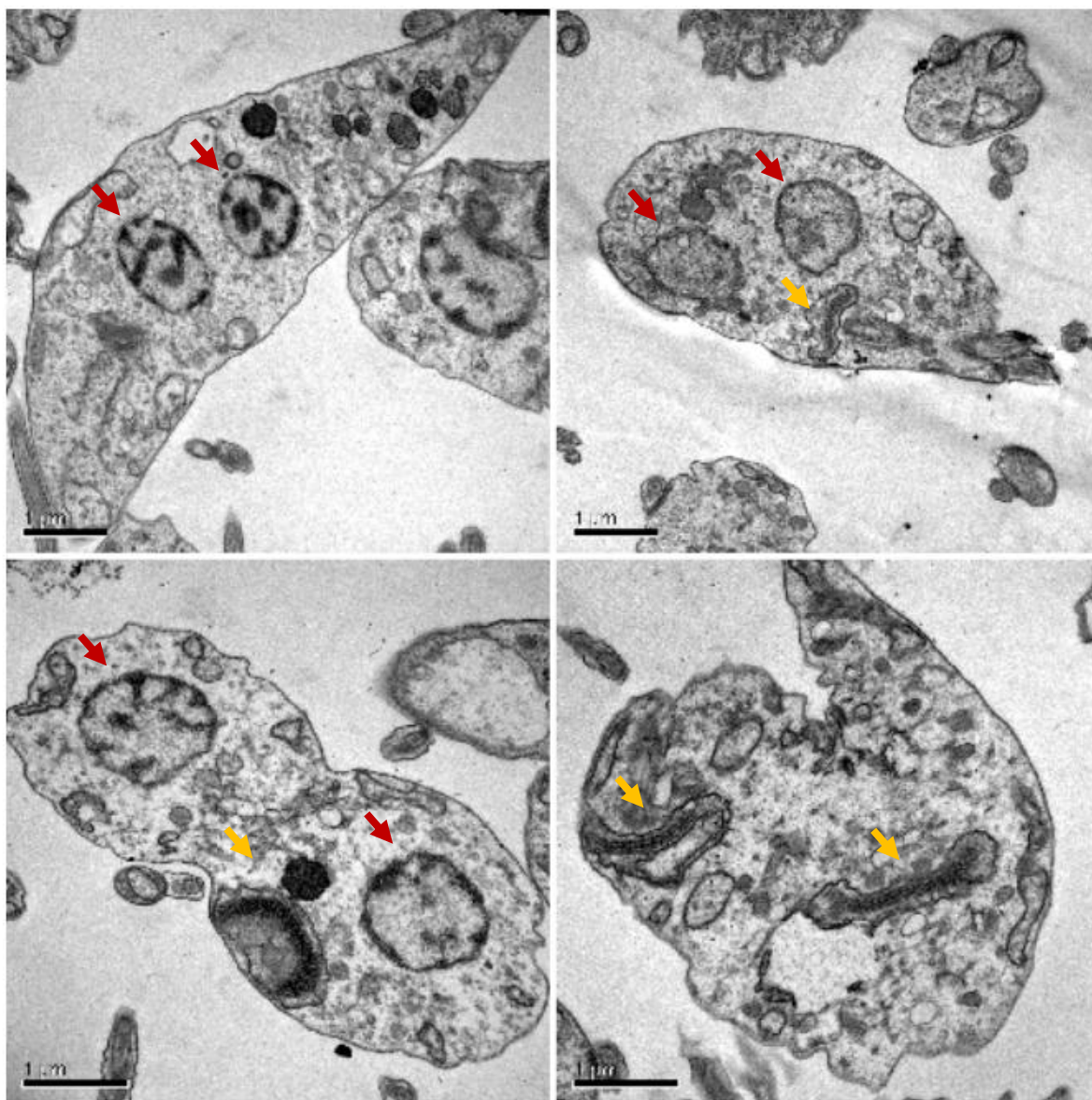


FIGURA 49 - ALTERAÇÃO NA DIVISÃO CELULAR DO PARASITA *Trypanosoma cruzi* CAUSADO PELO EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A VISUALIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA. As setas em vermelho indicam o núcleo e as setas em laranja indicam o cinetoplasto. Barra: 1 μ m.

A morfologia desses parasitas também foi analisada por microscopia óptica utilizando coloração por panótico rápido e alterações fenotípicas foram verificadas (FIGURAS 50, 51 e 52).

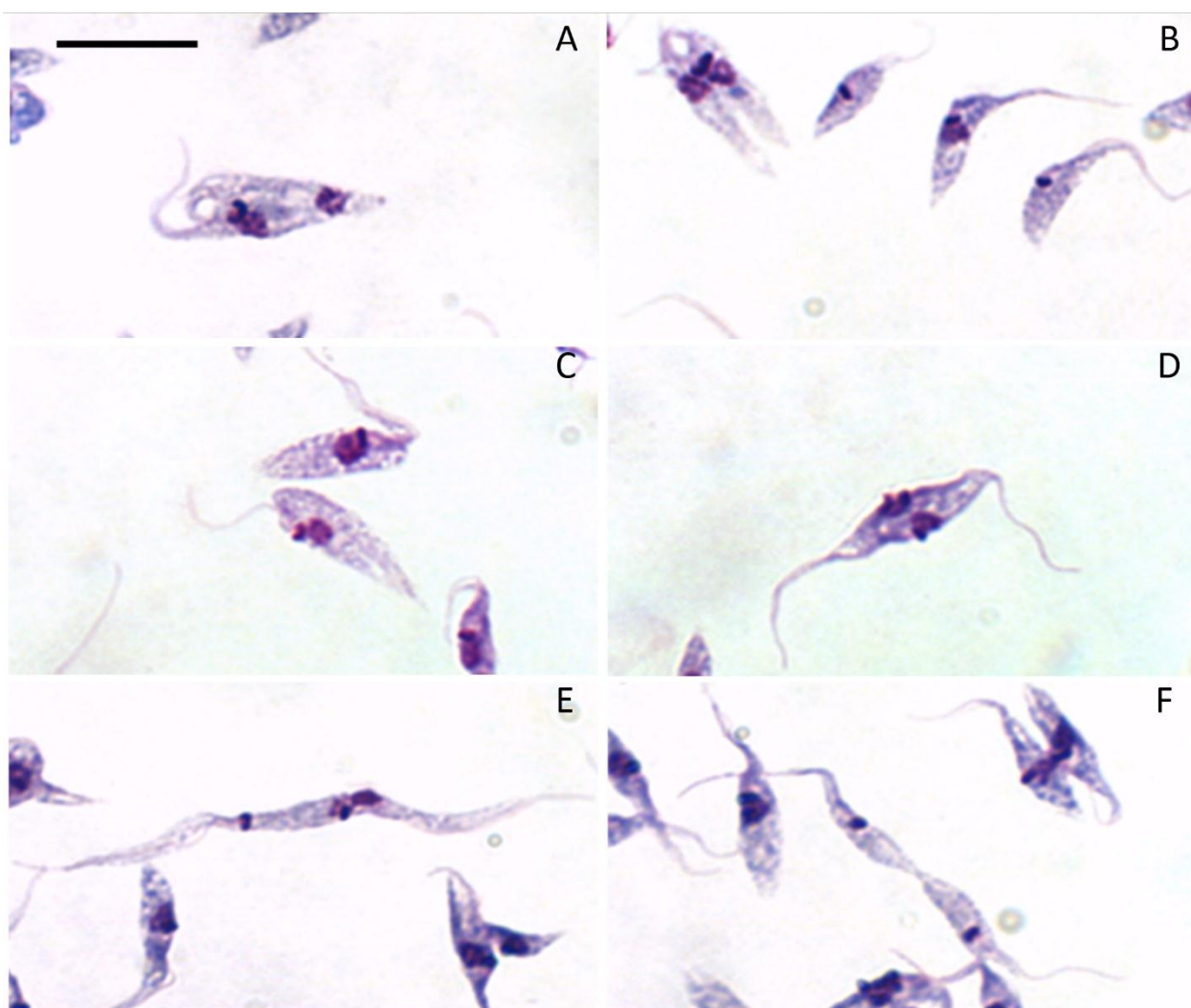


FIGURA 50 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR MICROSCOPIA ÓPTICA – PAINEL 1.

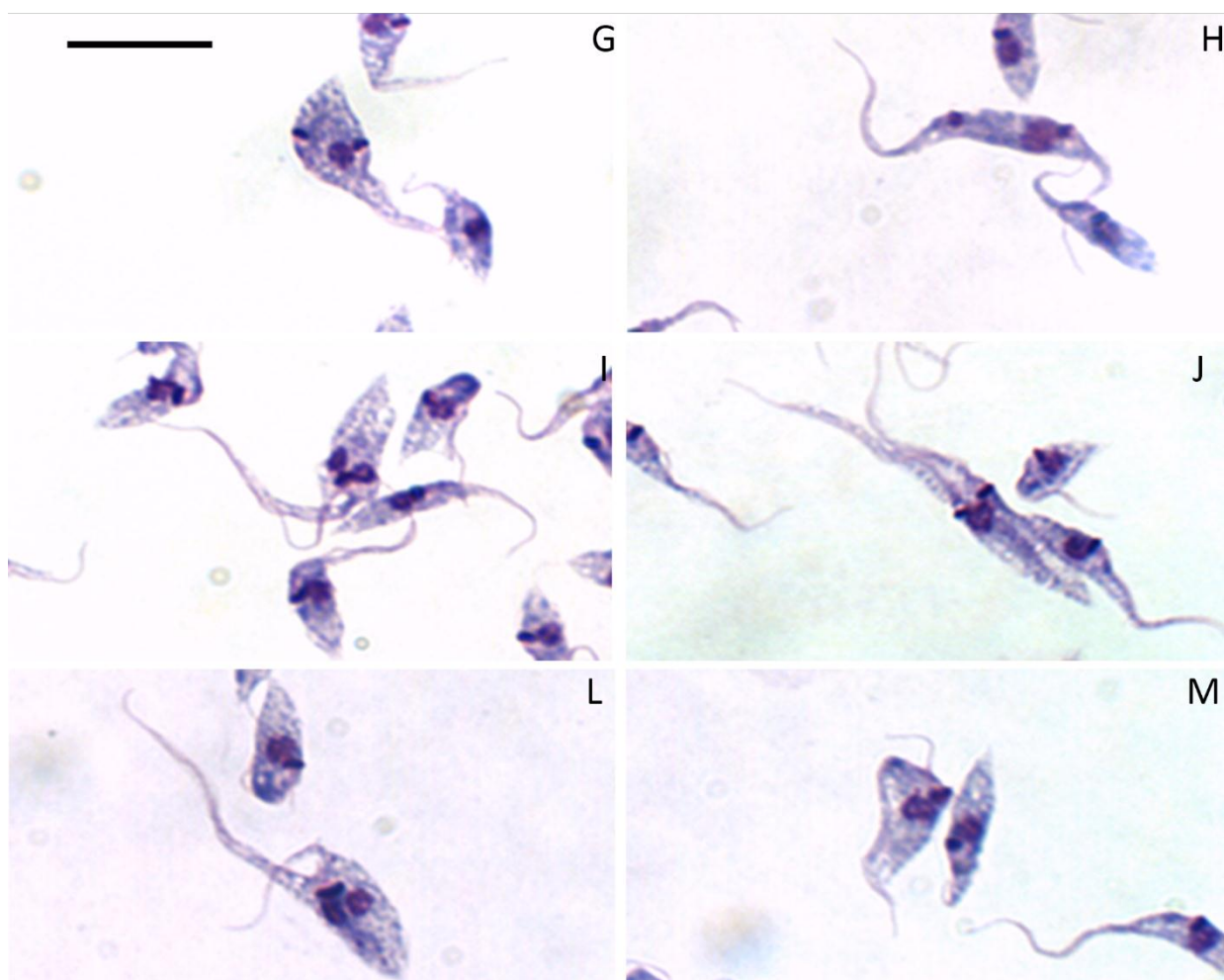


FIGURA 51 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR MICROSCOPIA ÓPTICA – PAINEL 2.

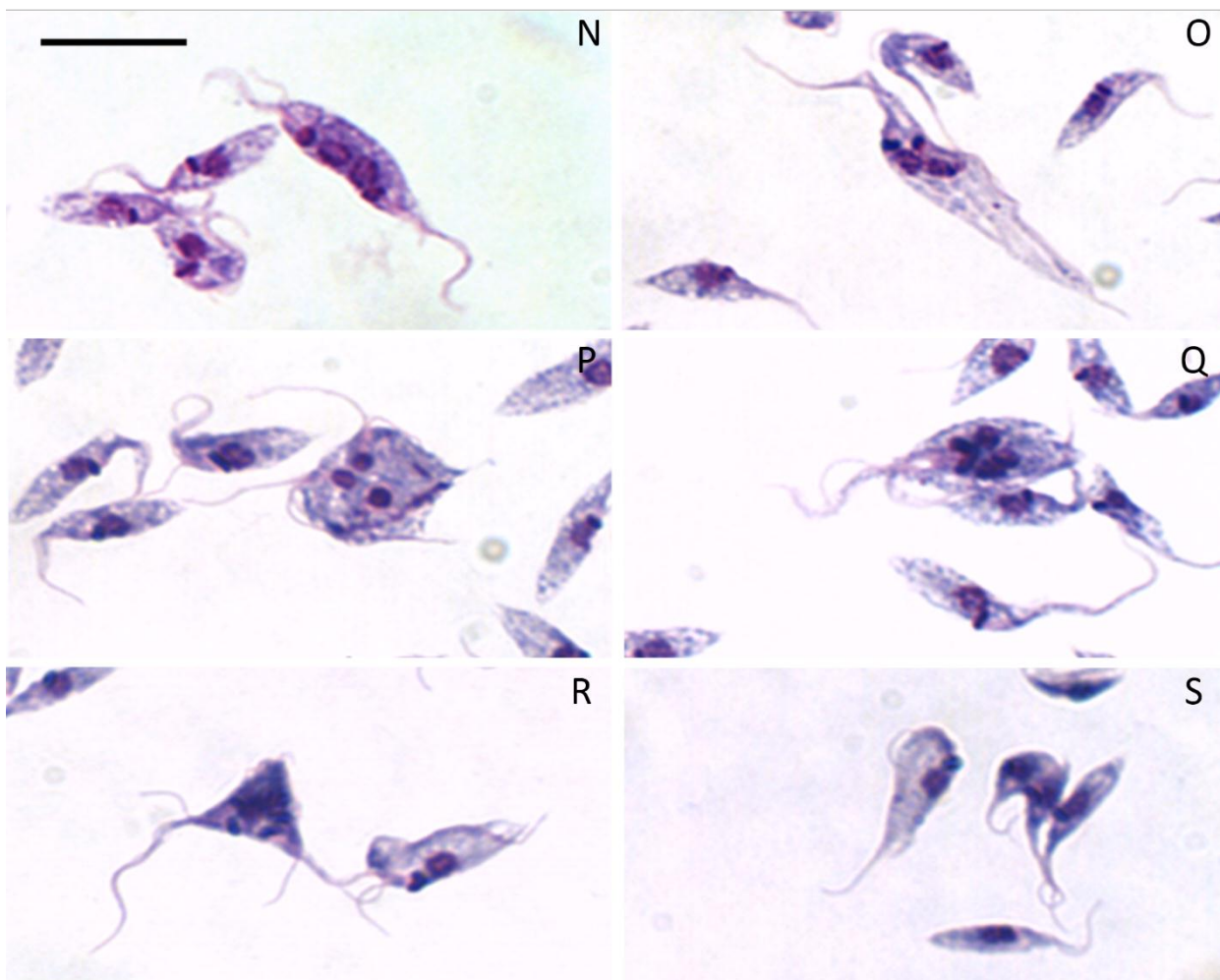


FIGURA 52 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE DD-TcDLPK39A NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR MICROSCOPIA ÓPTICA – PAINEL 3.

Pelos painéis expostos, notamos que visivelmente os parasitas sofrem alterações morfológicas e no ciclo celular. Podemos observar parasitas com fenótipo 1K, 2N1K, 3N, 3N3K entre outros.

Estes resultados nos indicam que TcDLP possa ter algum papel no processo de divisão celular no parasita *T. cruzi*.

4.4.2.2 Efeito dominante negativo de diversos mutantes utilizando as etiquetas HA e FLAG

Para comprovar as alterações vistas anteriormente, decidimos investir mais na

estratégia do efeito dominante negativo, mas agora adicionando outras mutações. As mutações utilizadas são estas abaixo relacionadas:

- TcDLP-K39A
- TcDLP-MAGMH391-395AAAAA
- TcDLP- Δ L4
- TcDLP-MAGMH391-395AAAAA/ Δ L4

A primeira mutação listada já foi usada anteriormente e como já sabido esta mutação impede a hidrólise de GTP em GDP (SCHMID; FROLOV, 2011), atividade essa importante para a completa cisão de membranas e/ou vesículas pela dinamina.

A segunda mutação está localizada no domínio central da proteína sendo importante para sua oligomerização. Com essa mutação a proteína forma dímeros estáveis impedindo a formação de tetrâmeros que são importantes para sua montagem em oligômeros (FAELBER *et al.*, 2012). A localização desta mutação na sequência aminoacídica da TcDLP pode ser observada na figura 53 a seguir.

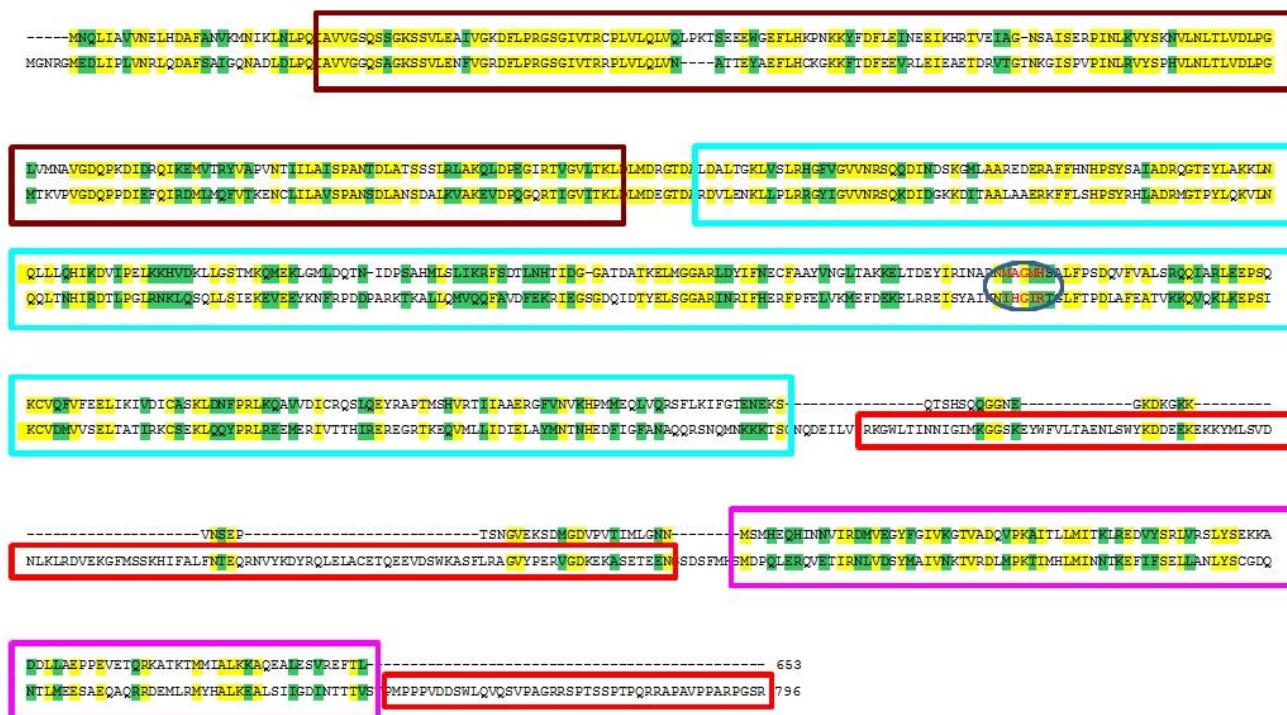


FIGURA 53 - REPRESENTAÇÃO DOS CINCO RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS MUTADOS PARA A OBTENÇÃO DA PROTEÍNA MUTANTE TcDLPMAGMH391-395AAAAA. As sequências aminoacídicas de TcDLP e Dinamin-1 de humanos estão alinhadas. A caixa marrom delimita o domínio G; a caixa azul ciano, o domínio central; a caixa vermelha, o domínio PH e caixa rosa, o domínio efetor da GTPase (GED). Dentro da elipse azul, destacados em vermelho, temos os resíduos de aminoácidos que foram modificados para alanina.

Essas duas mutações citadas acima já foram identificadas e caracterizadas em outros organismos (Tabela 3).

GTPase domain mutants						
Residue	In vitro characteristics				In vivo effect of overexpression	Reference
	Basal GTPase	Liposome-stimulated GTPase	GTP binding	Fission from SUPER templates		
WT	+++	+++++	++	+++	Supports CME	
K44A	–	–	Impaired	–	Strong DN mutant	Damke et al. (1994)
S42N	–	–	GDP only	–	Strong DN mutant	Marks et al. (2001)
S61D	+	+		n.d.	Weak DN mutant	Song et al. (2004b)
T65A	–	–	Impaired	n.d.	Strong DN mutant	Marks et al. (2001), Song et al. (2004b)
Q40E	++	–	WT	–	Strong DN mutant	Chappie et al. (2010)
T141A	+++	+++++	~WT	n.d.	Supports/Stimulates CME	Song et al. (2004b)
T141D	(–)	(–)	Impaired	n.d.	Strong DN mutant	Song et al. (2004b)
D180N ^a	++++	–	WT	–	Strong DN mutant	Chappie et al. (2010)
S41A	++	+	WT	–	Strong DN mutant	Chappie et al. (2010)
K142A	+	+++	WT	n.d.	Strong DN mutant	Marks et al. (2001)
	Quaternary structure	Self-assembly ^b	Liposome binding	Fission		
WT	tetramer	+++	++++	+++	Supports CME	
R361S	dimer	+	++	n.d.	DN mutant	Ramachandran et al. (2007)
R369W ^c	tetramer	+++++	+++++	n.d.	n.d. ^c	Wang et al. (2010)
R399A	dimer	(+)	+	–	DN mutant	Ramachandran et al. (2007)

QUADRO 2 – MUTAÇÕES NA DINAMINA E SUAS CARACTERÍSTICAS. *Wild type* (WT), não determinado (n.d.), endocitose mediada por clatrina (CME), dominante negativo (DN).

FONTE: modificado de SCHMID e FROLOV (2011).

A terceira mutação que listamos anteriormente (TcDLPΔL4) corresponde à deleção da região que seria o domínio PH nas dinaminas clássicas. De acordo com sua estrutura terciária chama-se essa região de *Loop 4* (FAELBER *et al.*, 2012). Apesar de TcDLP não conter o domínio PH é capaz de se ligar a lipídeos, como mostrado anteriormente na figura 34.

A quarta mutação citada é a combinação das mutações no domínio central e a deleção do *Loop 4*.

Para expressar esses genes mutados, modificamos um vetor previamente construído no Instituto Carlos Chagas (BATISTA *et al.*, 2010). As principais alterações no vetor foram a alteração das regiões que flanqueiam o gene de resistência e a introdução de sequências que codificam duas etiquetas: FLAG e HA (FIGURA 55). Estes vetores utilizam da tecnologia Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, USA) que se baseiam nas propriedades recombinacionais do bacteriófago Lambda (LANDY, 1989).

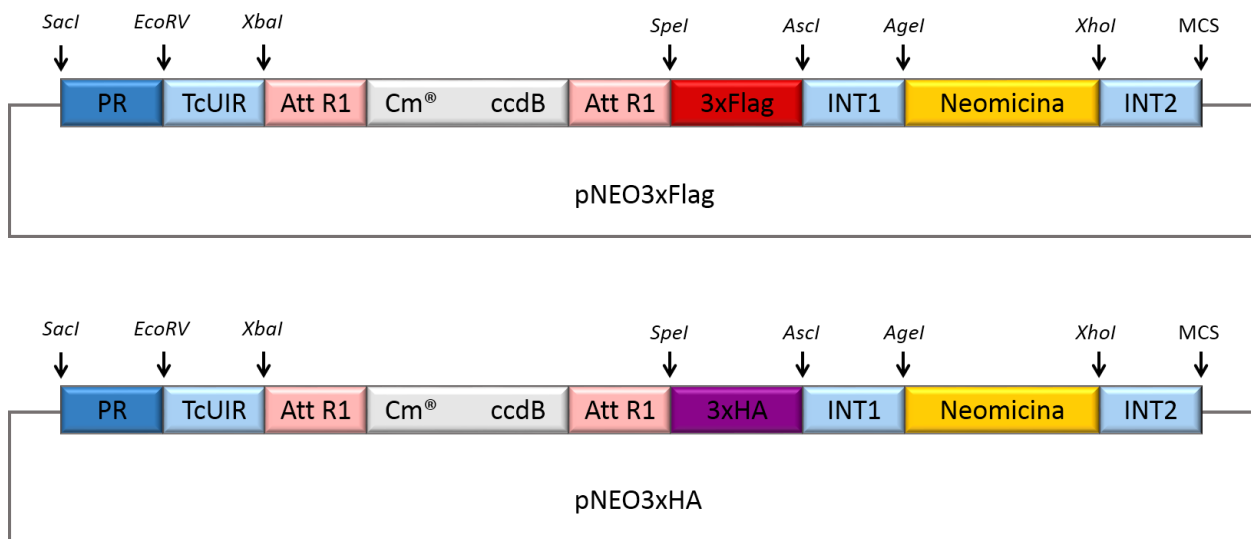


FIGURA 54 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS VETORES pNEO3xFlag E pNEO3xHA.

Após os vetores prontos, inserimos por recombinação o gene *Tcdlp* e suas formas mutantes nestes dois vetores de expressão. No total tínhamos 10 construções:

- pNEO3xFlag-TcDLP
- pNEO3xFlag-TcDLPK39A
- pNEO3xFlag-TcDLPMAGMH391-395AAAAA
- pNEO3xFlag-TcDLP Δ L4
- pNEO3xFlag-MAGMH391-395AAAAA/ Δ L4
- pNEO3xHA-TcDLP
- pNEO3xHA-TcDLPK39A
- pNEO3xHA-TcDLPMAGMH391-395AAAAA
- pNEO3xHA-TcDLP Δ L4
- pNEO3xHA-MAGMH391-395AAAAA/ Δ L4

Esses plasmídeos foram inseridos no *T. cruzi* utilizando a técnica de transfecção por eletroporação. Os parasitas transfectantes foram selecionados pela adição de G418 ao meio de cultura. A primeira etapa foi verificar, por *western blot*, a expressão das proteínas recombinantes mutadas ou não, contendo as etiquetas. Para fazer essa análise

reagimos os extratos dos transfectantes com os antissoros, anti-FLAG (FIGURA 55A), anti-HA (FIGURA 55B) e anti-TcDLP (FIGURA 56).

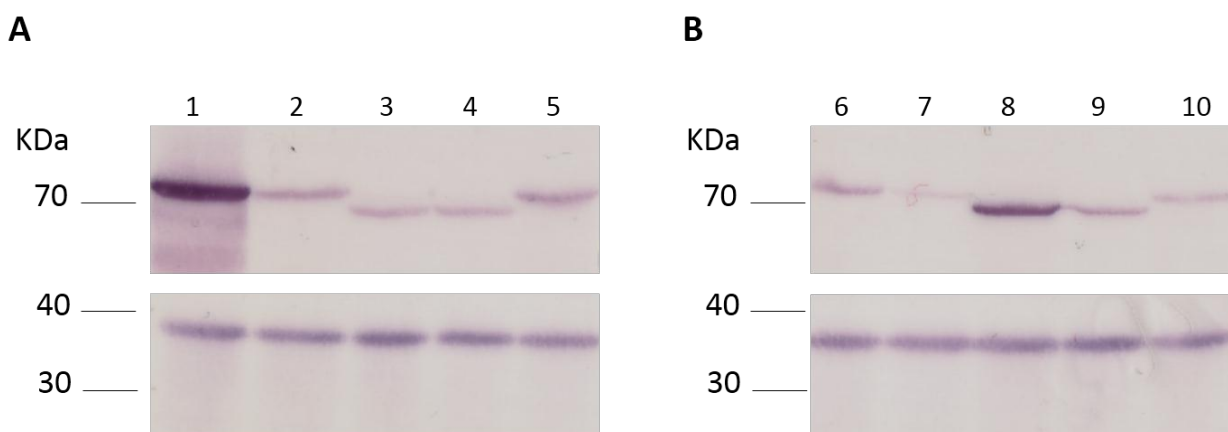


FIGURA 55 – ANÁLISE DAS EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *Trypanosoma cruzi* POR WESTERN BLOT. 1) Expressão de TcDLP-Flag, 2) TcDLPMAGMH391-395AAAAA-Flag, 3) TcDLP Δ L4-Flag, 4) TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-Flag, 5) TcDLPK39A-Flag, 6) TcDLP-HA, 7) TcDLPMAGMH391-395AAAAA-HA, 8) TcDLP Δ L4-HA, 9) TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA, 10) TcDLPK39A-HA.

Na figura 55 podemos perceber que a expressão da proteína recombinante não é a mesma para todas as culturas transfectadas. Esse resultado já era esperado, pois trata-se de uma expressão transiente (epissomal), o que gera uma população não homogênea. As culturas que expressam TcDLP-Flag (1) e TcDLP Δ L4-HA (8) foram as que obtiveram maior expressão. Na figura abaixo podemos comparar a expressão das proteínas recombinantes com a TcDLP endógena.

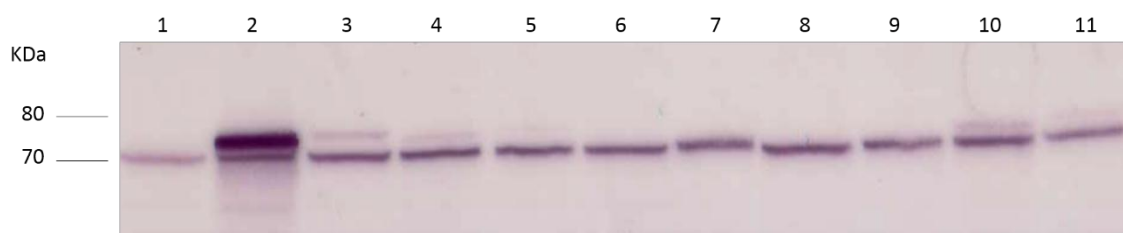


FIGURA 56 – ANÁLISE DAS EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *Trypanosoma cruzi* POR WESTERN BLOT. 1) *T. cruzi* do tipo selvagem, 2) Expressão de TcDLP-Flag, 3) TcDLP-HA, 4) TcDLPMAGMH391-395AAAAA-Flag, 5) TcDLPMAGMH391-395AAAAA-HA, 6) TcDLP Δ L4-Flag, 7) TcDLP Δ L4-HA, 8) TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-Flag, 9) TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA, 10) TcDLPK39A-Flag, 11) TcDLPK39A-HA.

Não podemos perceber a diferença de tamanho da TcDLP endógena em relação às proteínas recombinantes nas quais o Loop 4 foi deletado, pois o tamanho desse domínio deletado é igual devido a inserção da etiqueta, gerando uma proteína de aproximadamente 73 kDa (6-9). Mais uma vez podemos perceber que houve uma superexpressão de TcDLP-Flag (2).

O próximo passo foi analisar o perfil da curva crescimento destas culturas transfectadas. Como controle utilizamos as seguintes culturas:

- *T. cruzi* Dm28c (selvagem);
- *T. cruzi* Dm28c *dlp*^Δ*dlp::neo* (simples nocaute);
- *T. cruzi* Dm28c expressando GFP-Flag;
- *T. cruzi* Dm28c expressando GFP-HA.

O perfil de crescimento das culturas analisadas pode ser observado no gráfico abaixo.

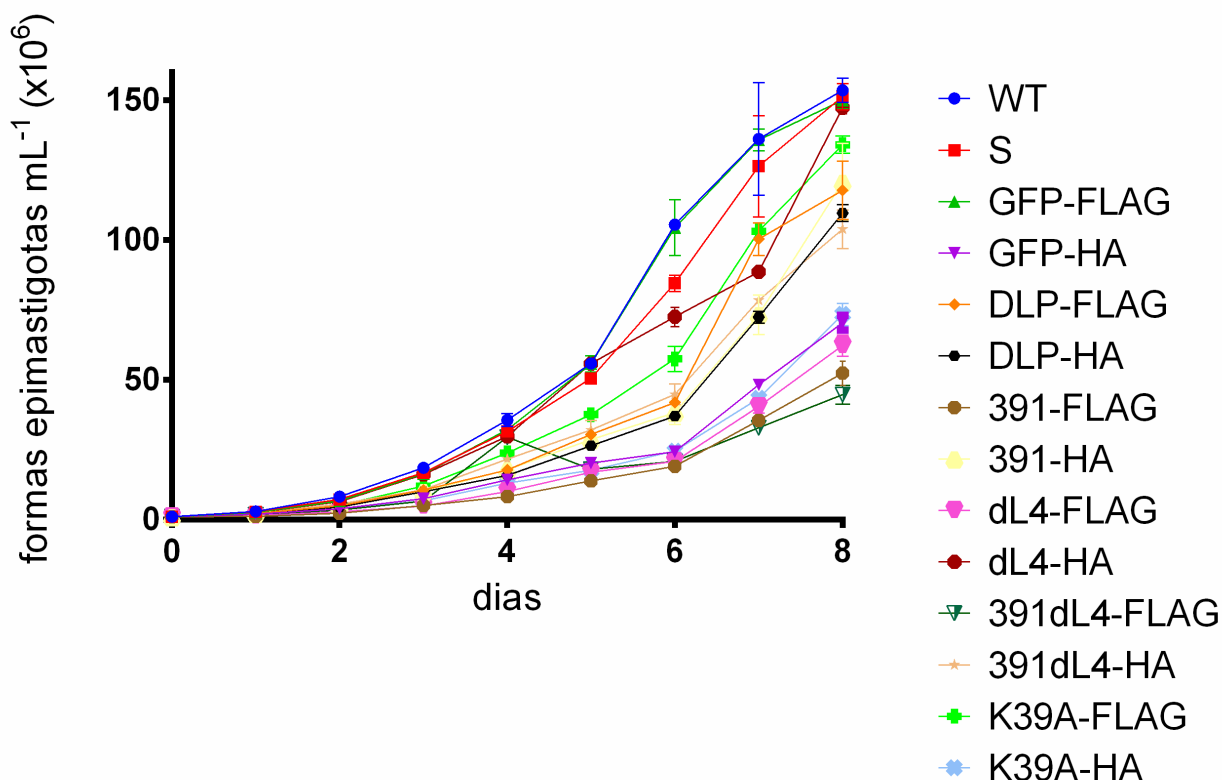


GRÁFICO 4 – CURVA DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE *Trypanosoma cruzi* EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS MUTANTES. Cepa *T. cruzi* do tipo selvagem = WT, *T. cruzi*^{dlp/neo} = S, TcDLPMAGMH391-395AAAAA-Flag = 391-Flag, TcDLPMAGMH391-395AAAAA-HA = 391-HA, TcDLPΔL4-Flag = dL4-Flag, TcDLPΔL4-HA = dL4-HA, TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4-Flag = 391dL4-Flag, TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4-HA = 391dL4-HA.

Com esse panorama geral da curva de crescimento, notamos que pelo menos 5 culturas tiveram o crescimento bem reduzido. São elas:

- *T. cruzi* Dm28c – GFP-HA;
- *T. cruzi* Dm28c – TcDLPMAGMH391-395AAAAA-Flag;
- *T. cruzi* Dm28c - TcDLPΔL4-Flag;
- *T. cruzi* Dm28c - TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4-Flag;
- *T. cruzi* Dm28c – TcDLPK39A-HA.

Vale aqui ressaltar que a cultura *T. cruzi* Dm28c – GFP-HA seria usada como um dos nossos controles, com o objetivo de comparar os resultados obtidos da expressão das TcDLP mutantes com a expressão de uma proteína qualquer, no caso a GFP,

contendo o tag HA. No entanto, identificamos que essa cultura possui um perfil de crescimento alterado. Para conseguirmos visualizar melhor, abaixo estão indicadas somente as curvas de crescimento de nossas culturas controle.

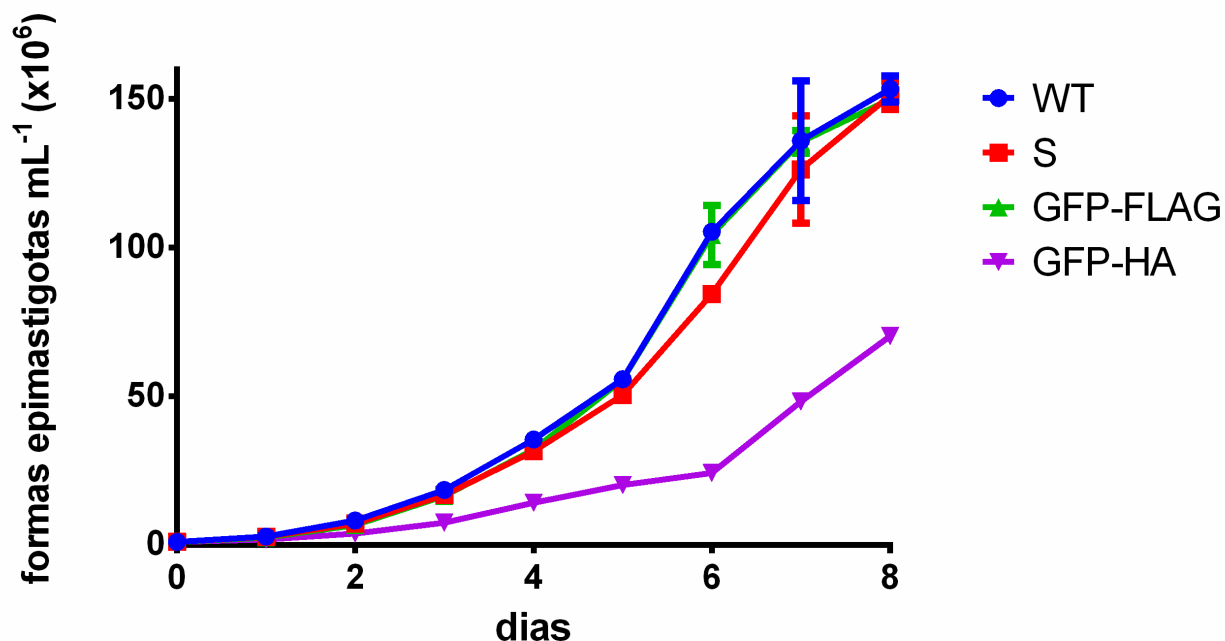


GRÁFICO 5 – CURVA DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS CONTROLE. Cepa *T. cruzi* do tipo selvagem = WT, *T. cruzi*^{dlp/Δdlp::neo} = S.

Como podemos perceber a cultura *T. cruzi* Dm28c expressando GFP-Flag possui o mesmo padrão de crescimento da cepa selvagem e da cepa simples nocaute. Isso significa que a expressão de GFP fusionada à etiqueta Flag não ocasiona alteração no crescimento do *T. cruzi* em cultura axênica. Portanto, pode ser usado como controle adequando nas análises posteriores.

4.4.2.2.1 Ensaio de endocitose por captação de transferrina das culturas efeito dominante negativo

Na tentativa de descobrir se TcDLP participa do processo endocítico no *T. cruzi* e se sim, em quais domínios especializados estaria envolvida, realizamos ensaio de endocitose com as culturas citadas anteriormente. A temperatura realizada neste ensaio foi de 12 °C. Nessa temperatura há uma redução do metabolismo do parasita, permitindo

que possamos acompanhar os eventos de endocitose. Para esse ensaio, utilizamos a transferrina acoplada ao AlexaFluor 633 (Invitrogen). Essa estratégia permitiu fazer ensaio de colocalização com TcDLP, já que por imunofluorescência indireta será detectada pelo anticorpo anti-IgG acoplado ao AlexaFluor 488 (Invitrogen).

Mostraremos primeiramente os resultados obtidos com a cultura controle (cepa selvagem) (FIGURA 57). Nos parasitas selvagens a TcDLP está localizada predominantemente na região da bolsa flagelar (seta laranja) (figura 58A e 58F).

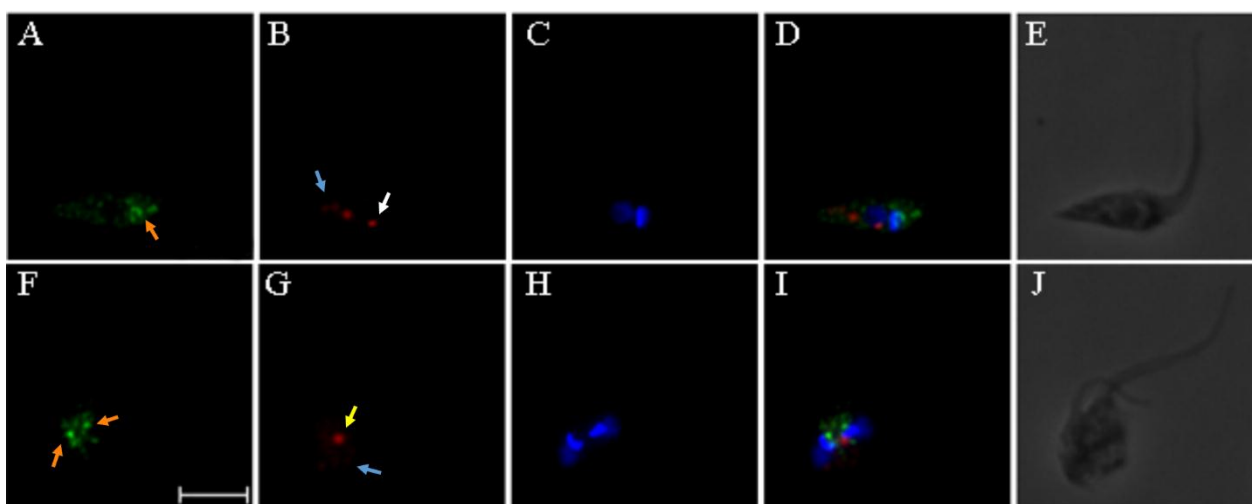


FIGURA 57 – ENSAIO DE ENDOCITOSE DE *Trypanosoma cruzi* Dm28c. A,F) Detecção de TcDLP utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B,G) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C,H) marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, D,I) Sobreposição das imagens anteriores. E,J) Contraste de fase. As setas laranja indicam a bolsa flagelar, a setas branca e amarela indicam o citóstoma e as setas azuis indicam os reservossomos. Barra = 5 μ m.

Na figura 57B, podemos perceber a transferrina sendo captada através do citóstoma (seta branca) e sendo depositada nos reservossomos (seta azul). A transferrina parece estar percorrendo um caminho. Na figura 57G, o parasita está em divisão e a forte marcação indicada pela seta amarela, também nos leva a acreditar que é o citóstoma ainda sendo compartilhado pelas duas células. Pode-se perceber, também, a localização da transferrina nos reservossomos localizados na porção posterior dos parasitas em divisão.

Na figura 58, temos a cultura de *T. cruzi* expressando GFP-Flag. Também

podemos notar a transferrina localizada no citóstoma (seta branca) e nos reservossomos (seta azul) (FIGURA 58C). A localização de GFP-Flag, utilizando anti-Flag, é difusa ao longo do parasita (FIGURA 58A).

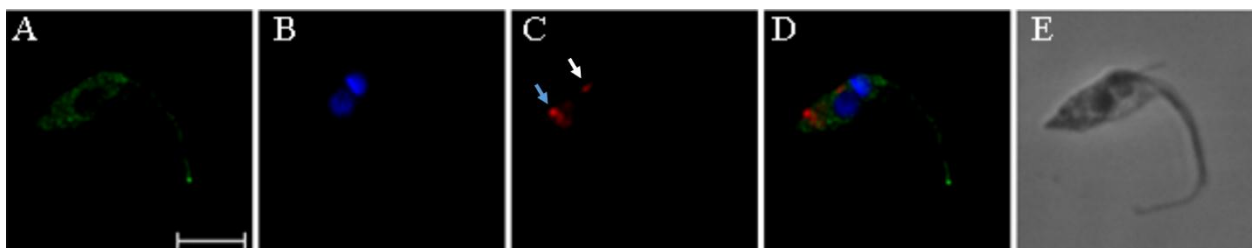


FIGURA 58 – ENSAIO DE ENDOCITOSE DE *Trypanosoma cruzi* EXPRESSANDO GFP-FLAG. A) Detecção de GFP-Flag utilizando anti-Flag e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342. C) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. D) Sobreposição das imagens anteriores. E) Contraste de fase. A seta branca indica o citóstoma e a seta azul, os reservossomos. Barra = 5 μ m.

Quando analisamos as culturas transfectantes superexpressando TcDLP e suas formas mutantes dominantes negativos obtivemos resultados interessantes. Conforme mostrado nas figuras 59 e 60.

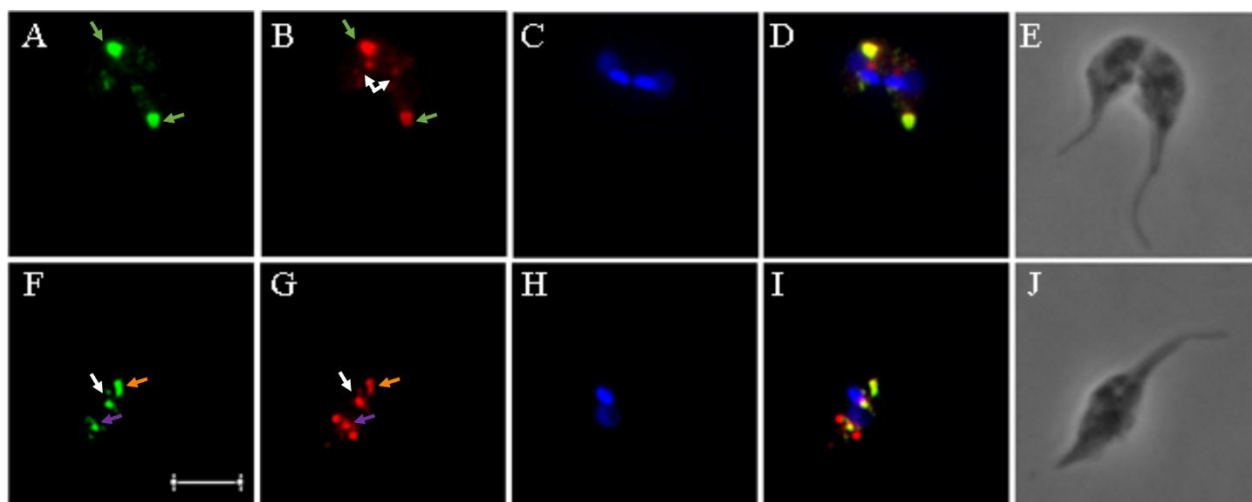


FIGURA 59 – ENSAIO DE ENDOCITOSE DE *Trypanosoma cruzi* EXPRESSANDO TcDLP-FLAG. A,F) Detecção de TcDLP-Flag utilizando anti-Flag e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B,G) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C,H) marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342. D,I) Sobreposição das imagens anteriores. E,J) Contraste de fase. As setas laranja indicam a bolsa flagelar, as setas verdes indicam uma estrutura indefinida, as setas brancas indicam o citóstoma e as setas roxas indicam o fundo do complexo citóstoma/citofaringe. Barra = 5 μ m.

Na figura 59 acima mostramos o ensaio de endocitose da cultura de *T. cruzi* expressando TcDLP-Flag (FIGURA 59A), onde a marcação dessa proteína foi revelada usando anticorpo monoclonal anti-Flag. Esta cultura superexpressa TcDLP-Flag conforme mostrado por *western blot* nas figuras 55 e 56.

Percebemos uma clara colocalização da TcDLP com a transferrina (FIGURA 59D), sugerindo que TcDLP participa do processo endocítico em *T. cruzi*. Analisando as Figuras 59F, G e I, concluímos também que TcDLP, participa da captação da transferrina pelo citóstoma (entrada do citóstoma, setas brancas e fundo do complexo citóstoma/citofaringe, setas roxas) e também pela bolsa flagelar (setas laranja). As figuras da linha superior (A, B, C, D e E) mostram um parasita em divisão. As setas verdes apontam uma estrutura onde TcDLP e transferrina se colocalizam. Essa estrutura, de acordo com o padrão observado, parece ser a região correspondente à bolsa flagelar. No entanto, no parasita à esquerda, a posição da bolsa flagelar está alterada, localizando-se na região posterior. Segundo De Souza e colaboradores (2009) a bolsa flagelar é formada por uma depressão lateral na região anterior da célula de onde o flagelo emerge.

A figura 60 a seguir exemplifica o padrão de marcação visto na cultura de *T. cruzi* superexpressando TcDLP-Flag, onde TcDLP se colocaliza com a transferrina na região da bolsa flagelar.

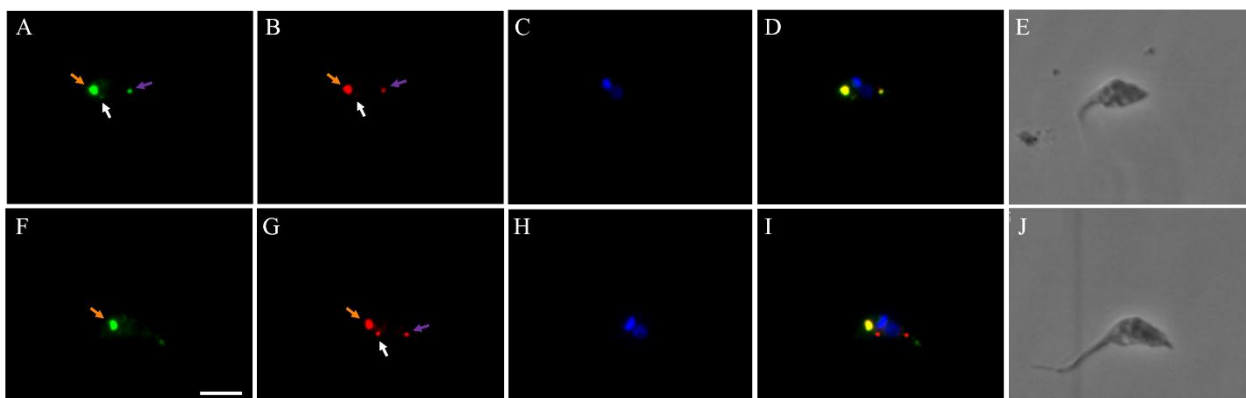


FIGURA 60 – ENSAIO DE ENDOCITOSE DE *Trypanosoma cruzi* EXPRESSANDO TcDLP-FLAG. A,F) Detecção de TcDLP endógena e TcDLP-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B,G) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C,H) marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, D,I) Sobreposição das imagens anteriores. E,J) Contraste de fase. As setas laranja indicam a bolsa flagelar, as setas brancas indicam o citóstoma e as setas roxas indicam o fundo do complexo citóstoma/citofaringe. Barra = 5 µm.

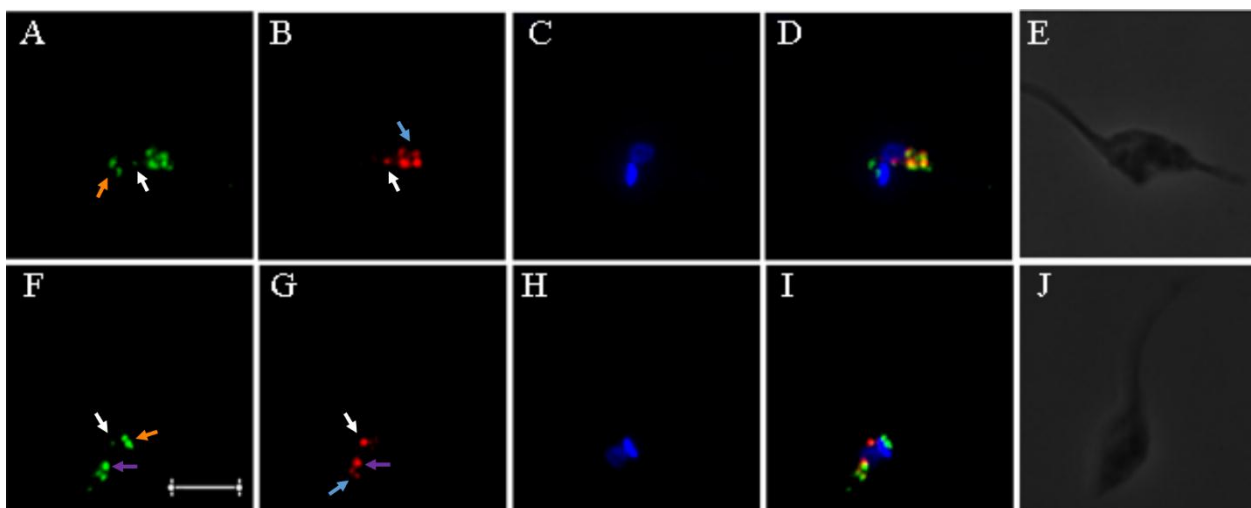


FIGURA 62 – ENSAIO DE ENDOCITOSE DE *Trypanosoma cruzi* EXPRESSANDO TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ΔL4-HA. A,F) Detecção de TcDLP MAGMH391-395AAAAA/ΔL4-HA utilizando anti-HA e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B,G) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C,H) marcação de ácidos nucléicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342. D,I) Sobreposição das imagens anteriores. E,J) Contraste de fase. As setas laranja indicam a bolsa flagelar, as setas brancas indicam o citóstoma, as setas roxas indicam o fundo do complexo citóstoma/citofaringe e as setas azuis, os reservossomos. Barra = 5 μ m.

Este dado nos sugere que TcDLP também possa participar do tráfego de vesículas na região posterior do parasita, entregando aos reservossomos as macromoléculas captadas pela complexo citóstoma-citofaringe e pela bolsa flagelar.

4.4.2.2.2 Análise das culturas mutantes com efeito dominante negativo por citometria de fluxo

Verificamos por citometria de fluxo se estava ocorrendo alguma alteração no ciclo celular devido ao efeito dominante negativo nos parasitas transfectados. Após análise percebemos que algumas culturas apresentavam um padrão em que o pico de G2 estava deslocado para esquerda. A tabela abaixo mostra os valores obtidos neste ensaio. Espera-se que na fase G2 a célula tenha duplicado totalmente seu material genético, tendo então duas vezes mais quantidade de DNA em relação a G1. No entanto, em algumas culturas a relação G2/G1 ficou 5% menor do esperado, como pode ser visto na tabela 4.

Cultura	G1	G2	G2/G1
WT	286	590	2,06
S	286	590	2,06
GFP-Flag	294	580	1,97
GFP-HA	292	590	2,02
TcDLP-Flag	289	575	1,99
TcDLP-HA	291	576	1,98
TcDLP391-Flag	289	570	1,97
TcDLP391-HA	286	548	1,92
TcDLPΔL4-Flag	291	570	1,96
TcDLPΔL4-HA	289	556	1,92
TcDLP391/ΔL4-Flag	291	583	2,00
TcDLP391/ΔL4-HA	289	548	1,90
TcDLPK39A-Flag	287	544	1,90
TcDLPK39A-HA	296	564	1,91

TABELA 2 – ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CULTURAS EFEITO DOMINANTE NEGATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Para melhor visualizar o que está acontecendo mostramos os gráficos representando o ciclo celular das 5 culturas com as menores relações G2/G1.

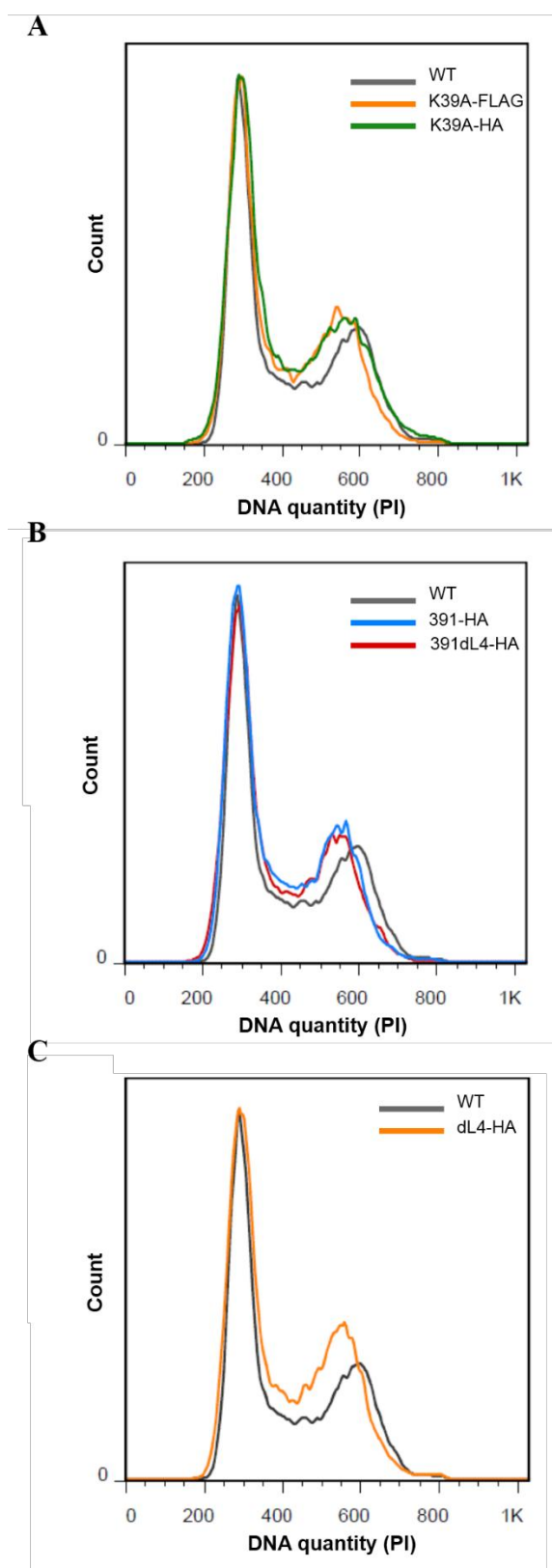


GRÁFICO 6 – ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CULTURAS EFEITO DOMINANTE NEGATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Como podemos perceber, há um visível deslocamento do pico referente a G2 para a esquerda. Este resultado nos leva a levantar a hipótese que estas populações de parasitas transfectados não está duplicando o material genético adequadamente.

Outra importante observação foi o aumento do número de células em G2, o que pode ser visto nas culturas que expressam TcDLP Δ L4-Flag e TcDLP Δ L4-Flag (GRÁFICO 7). Quando analisamos novamente o gráfico da curva de crescimento percebemos que estas culturas fazem parte das quatro culturas com menor taxa de crescimento, juntamente com a cultura que expressa GFP-HA.

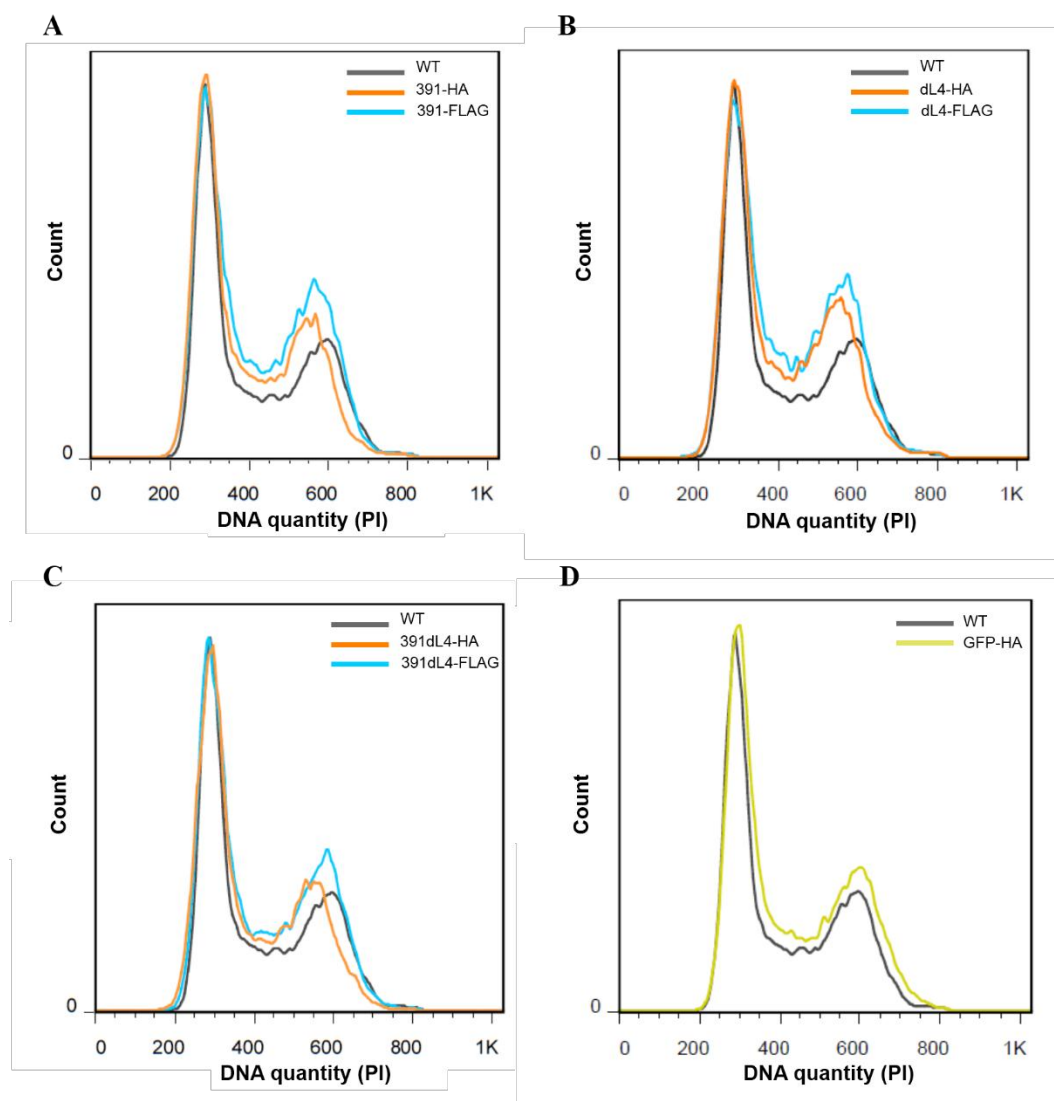


GRÁFICO 7 – ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CULTURAS EFEITO DOMINANTE NEGATIVO POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Apesar da cultura *T. cruzi* GFP-HA também ter um perfil de crescimento alterado, não observamos uma alteração significativa no ciclo celular. Quando observamos a fluorescência fornecida pela GFP desta cultura por citometria de fluxo, não observamos a expressão da mesma. O mesmo não aconteceu para a cultura *T. cruzi* GFP-Flag, onde se pode observar uma grande população expressando GFP (dado não mostrado).

De acordo com estes resultados, entendemos que por ser uma expressão episomal, ao longo das passagens para a manutenção da cultura, o plasmídeo tenha sido eliminado. Esta cultura, então, estaria sendo afetada pela droga adicionada (G418), já que não mais seria resistente a este antibiótico.

Já as outras culturas citadas acima estariam sofrendo um retardamento da citocinese, acumulando então parasitas na fase G2 do ciclo celular. Verificamos por ensaio de imunofluorescência algumas ocorrências que podem explicar estas alterações no ciclo celular mostradas por citometria de fluxo.

4.4.2.2.3 Análise do efeito dominante negativo por imunofluorescência

Análise por imunofluorescência nos permitiu identificar parasitas com apenas o cinetoplasto (fenótipo 1K – FIGURAS 63 e 64) ou apenas o núcleo (fenótipo 1N – FIGURA 65), o que poderia explicar o deslocamento do pico de G2 para a esquerda, quando estes parasitas duplicam seu material genético. Este mesmo fenótipo foi mostrado anteriormente, por microscopia óptica, quando expressamos TcDLPK39A utilizando o sistema DD (Figura 50B e F). A figura 50F, por exemplo, mostra dois parasitas, aparentemente no final da divisão, contendo apenas o cinetoplasto.

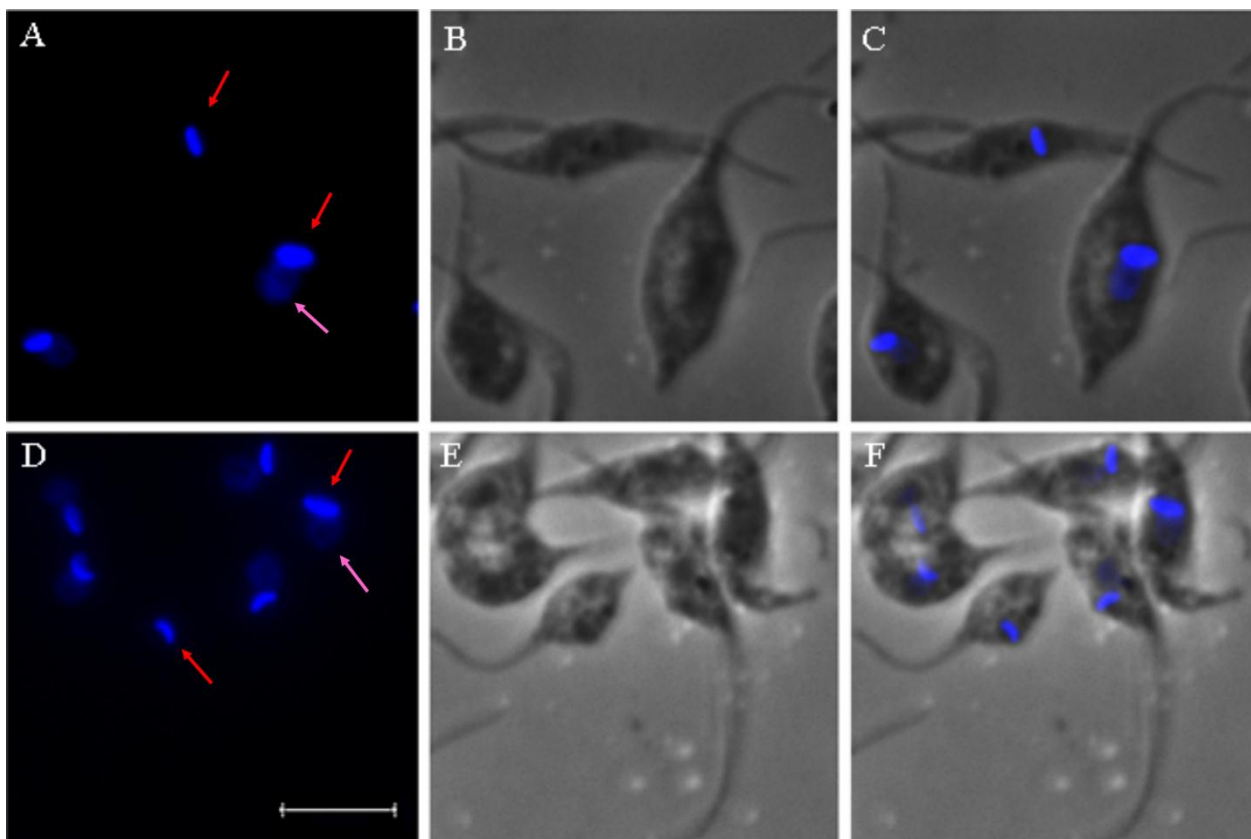


FIGURA 63 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITAS CONTENDO APENAS UM CINETOPLASTO. (A-C) Expressão de TcDLPMAGMH391-395AAAAA-HA. (D-F) TcDLPMAGMH391-395AAAAA-Flag. A,D) marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342. B,E) Contraste de fase. C,F) Sobreposição das imagens anteriores. Barra = 5 μ m.

Na figura abaixo mostramos a localização de TcDLPMAGMH391-395AAAAA-Flag em um parasita com o fenótipo 1K.

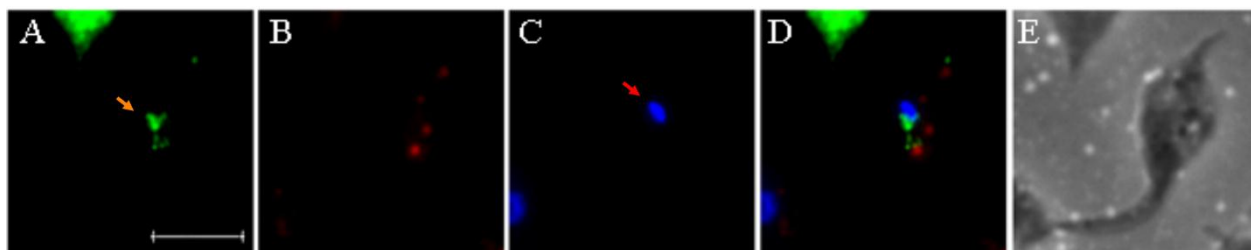


FIGURA 64 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO APENAS UM CINETOPLASTO. A) Detecção de TcDLP MAGMH391-395AAAAA-Flag utilizando anti-Flag e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, D) Sobreposição das imagens anteriores. E) Contraste de fase. A seta laranja indica a bolsa flagelar e a seta vermelha, o cinetoplasto. Barra = 5 μ m.

Podemos perceber que a proteína mutante recombinante, assim como mostrado para TcDLP endógena, se encontra majoritariamente na região correspondente à bolsa flagelar (FIGURA 64A). O parasita 1K é capaz de fazer endocitose, como mostrado na Figura 64B, onde ocorreu a captação de transferrina acoplada ao AlexaFluor633 (Invitrogen).

Conforme dito anteriormente, também foi possível observar por imunofluorescência parasitas contendo apenas o núcleo (FIGURA 65).

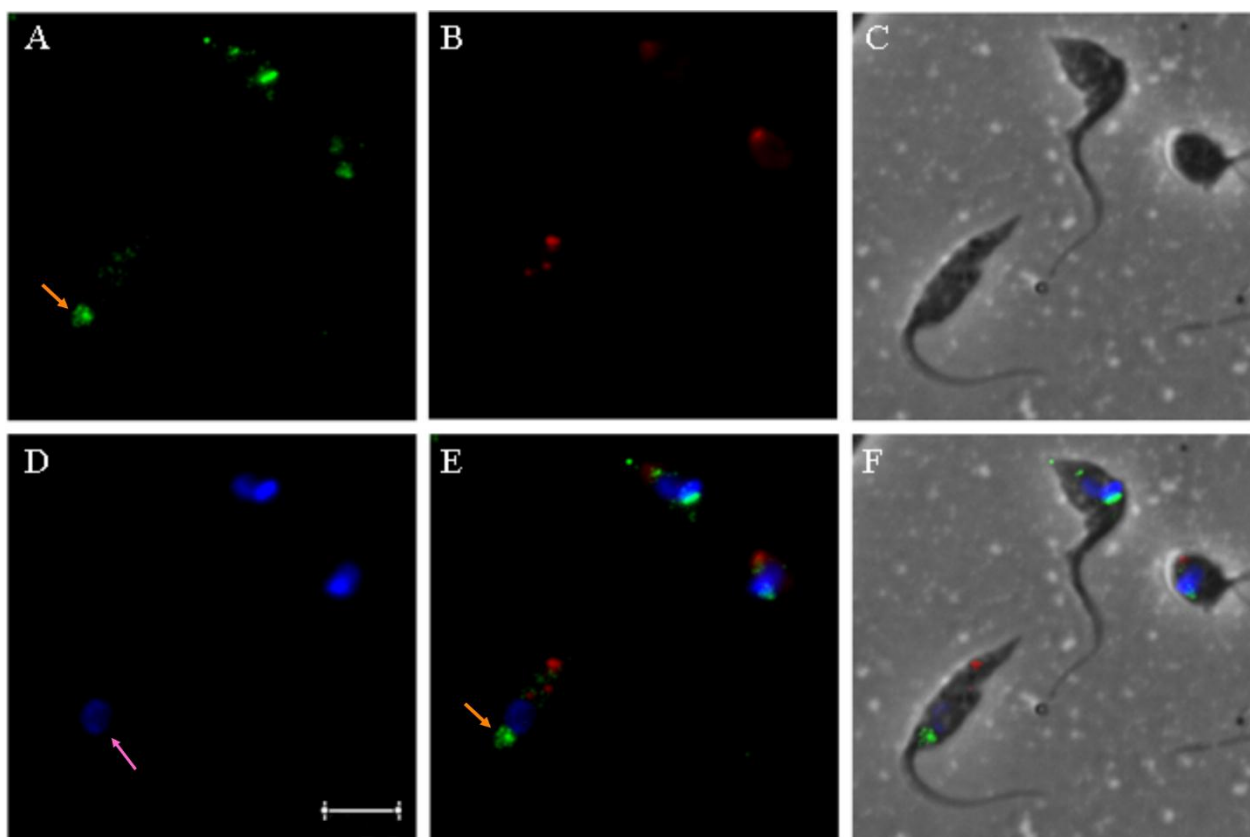


FIGURA 65 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO APENAS UM NÚCLEO. A) Detecção de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucléicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta laranja indica a bolsa flagelar e a seta rosa, o núcleo. Barra = 5 μ m.

Também nos chamou a atenção, a observação de células que aparentemente tem o tamanho do núcleo e/ou o cinetoplasto reduzido. Na figura a seguir (FIGURA 66), estes

parasitas estão indicados pelas setas brancas.

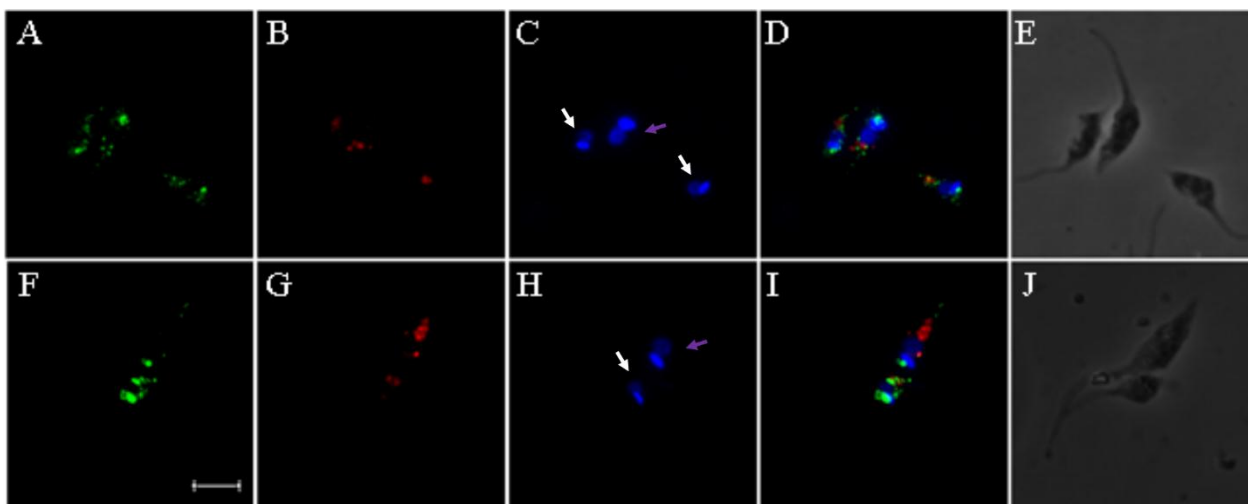


FIGURA 66 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE MUTANTES DE TcDLP NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO MATERIAL GENÉTICO REDUZIDO. (A-E) Efeito dominante negativo da expressão de TcDLP MAGMH391-395AAAAA-HA. (F-J) Efeito dominante negativo da expressão de TcDLP K39A-Flag. A) Detecção de TcDLP endógena e de TcDLP MAGMH391-395AAAAA-HA utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. F) Detecção de TcDLP K39A-Flag utilizando anti-Flag e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B,G) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C,H) marcação de ácidos nucléicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, D,I) Sobreposição das imagens anteriores. E,J) Contraste de fase. As setas roxas apontam parasitas normais e as setas brancas, os parasitas com material genético reduzido. Barra = 5 μ m.

Esta alteração nos leva a pensar que os parasitas estariam com o material genético reduzido. Pelas imagens em contraste de fase (E e J), podemos perceber que estes parasitas são menores que os parasitas aqui mostrados como normais (setas roxas). Este efeito dominante negativo também poderia ser responsável pela deslocamento do pico G2 para a esquerda.

Por algum motivo está ocorrendo uma perda de controle da duplicação e da divisão das organelas que contém material genético durante a divisão celular ou citocinese.

No entanto, da mesma maneira que observamos parasitas aparentando ter a estrutura nuclear e o cinetoplasto reduzidas, também foi possível observar parasitas com estas estruturas aumentadas. Esta situação pode ser observada nas figuras 67 e 68.

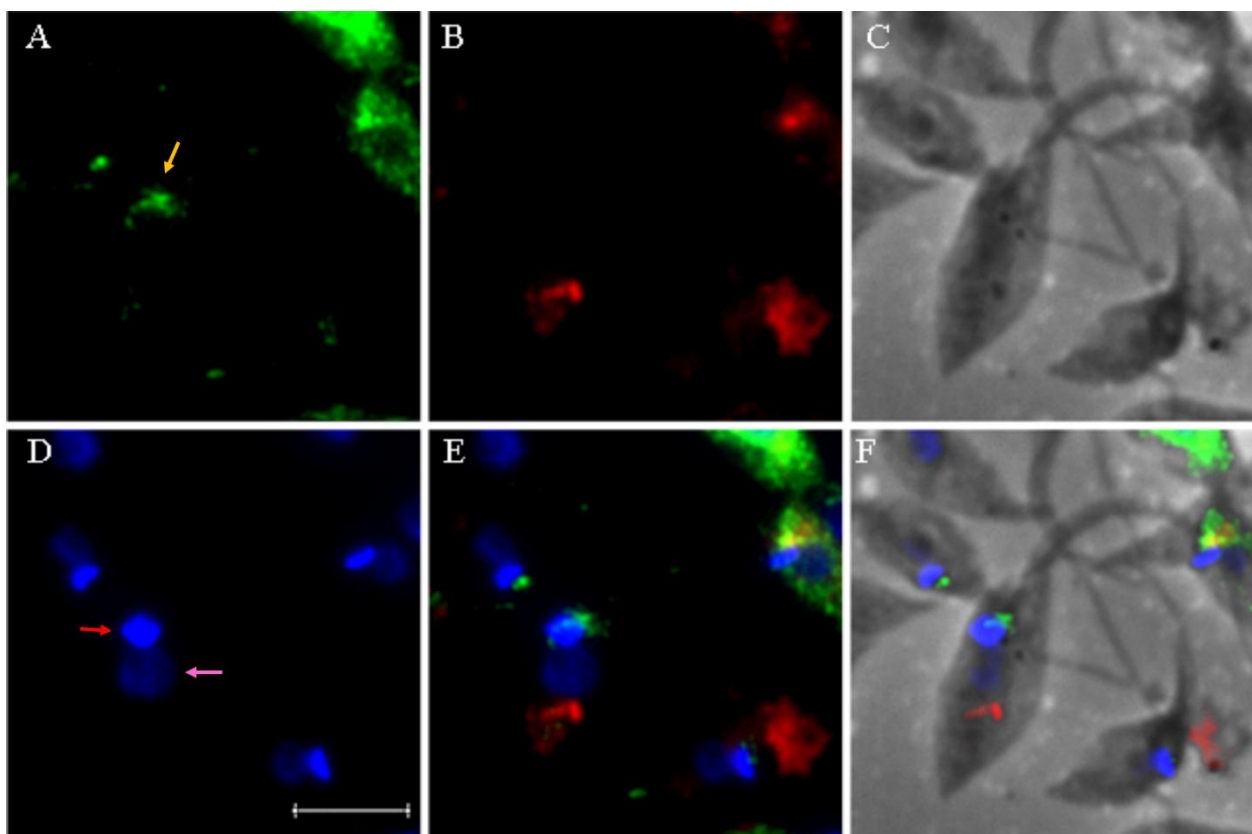


FIGURA 67 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO MATERIAL GENÉTICO AUMENTADO (PAINEL 1). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta laranja indica a bolsa flagelar, a seta vermelha aponta o cinetoplasto e a seta rosa, o núcleo. Barra = 5 μ m.

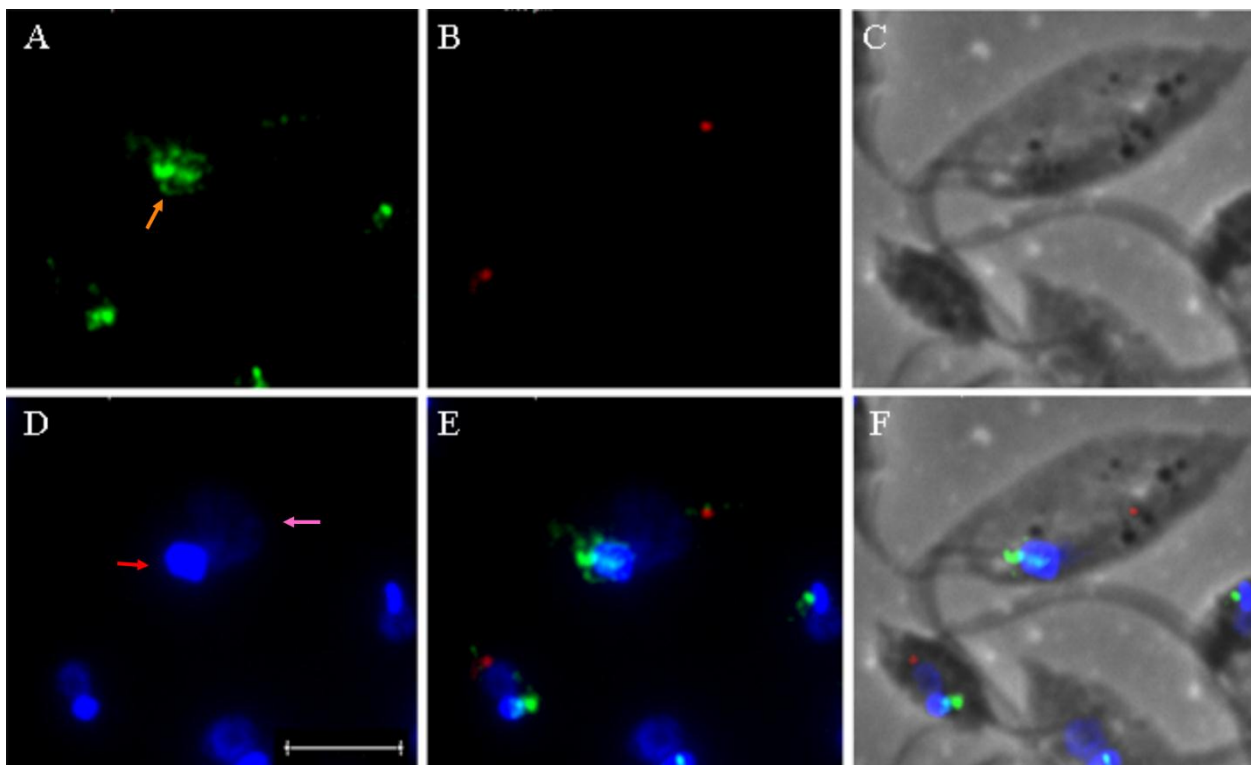


FIGURA 68 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO MATERIAL GENÉTICO AUMENTADO (PAINEL 2). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucléicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342. E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta laranja indica a bolsa flagelar, a seta vermelha aponta o cinetoplasto e a seta rosa, o núcleo. Barra = 5 μ m.

Estes parasitas em destaque parecem estar com a citocinese atrasada. Pelas imagens em contraste de fase parece que o flagelo já está duplicado, mas a citocinese ainda não foi disparada, podendo estar passando por etapas consecutivas de duplicação da material genético e de suas organelas e por isso, o tamanho e volume celulares acabam também aumentando consideravelmente. A figura 69 também mostra outro evento como este.

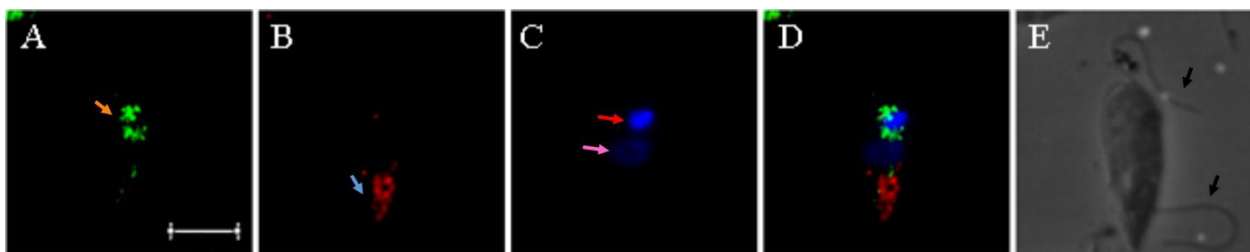


FIGURA 69 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO MATERIAL GENÉTICO AUMENTADO. A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342. D) Sobreposição das imagens anteriores. E) Contraste de fase. A seta laranja indica a bolsa flagelar, a seta azul aponta os reservossoms, a seta vermelha aponta o cinetoplasto, a seta rosa indica o núcleo e as setas pretas, os flagelos. Barra = 5 μ m.

Nesta figura é bem claro que o parasita já está com o segundo flagelo bem desenvolvido. No entanto, ainda não entrou em divisão. A estrutura nuclear também está aumentada, bem como o tamanho do parasita.

Segundo Elias *et al.* (2011), o crescimento do novo flagelo ocorre quando termina a duplicação do material genético, estando a célula, então, na fase G2 do ciclo celular. Quando o parasita começa a segregar o cinetoplasto, o flagelo tem de 1/3 a 1/4 do tamanho do flagelo antigo. Podemos perceber que o cinetoplasto não está se dividindo e o novo flagelo já está bem desenvolvido.

Com estes resultados podemos inferir que TcDLP também é importante no processo de disparo da citocinese.

As figuras que seguem também mostram irregularidades na divisão do DNA nuclear e mitocondrial.

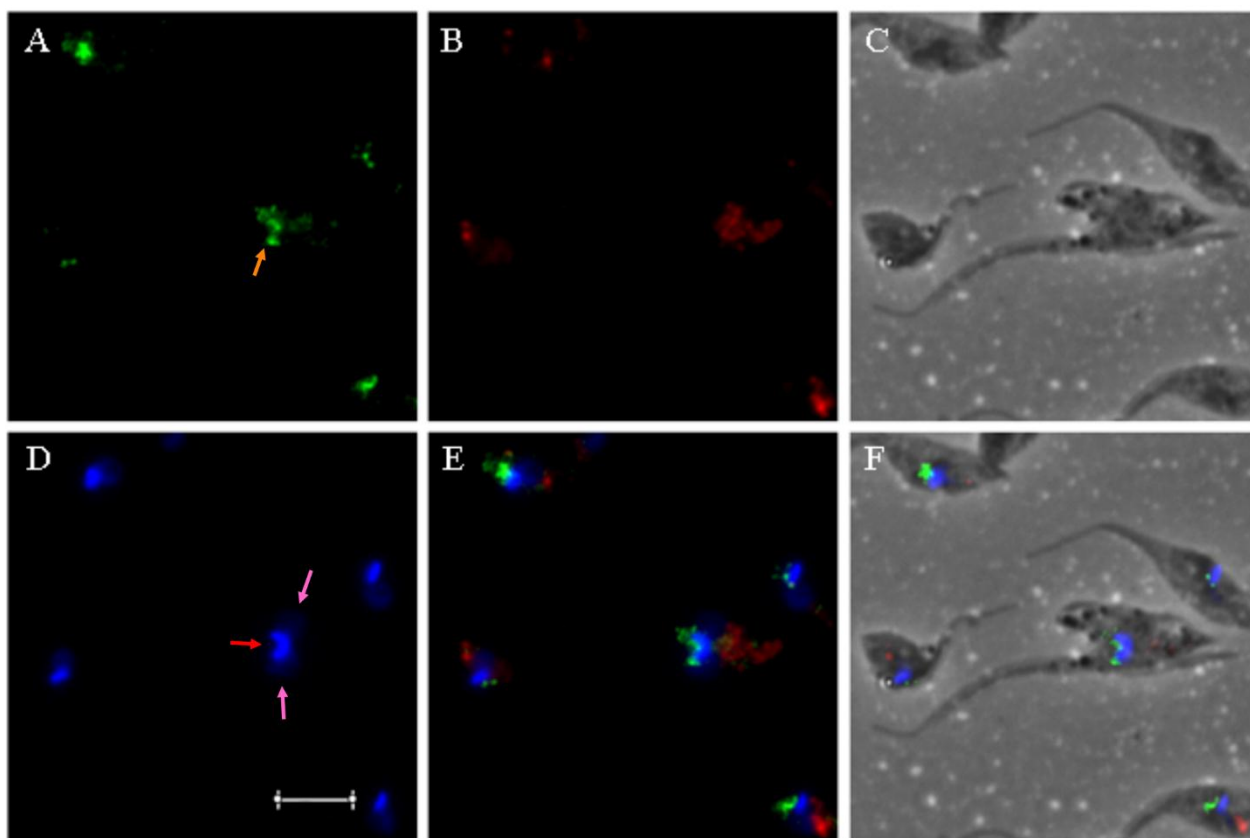


FIGURA 70 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 1). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta laranja indica a bolsa flagelar, a seta vermelha aponta o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

O parasita apresentado em destaque foi extensivamente encontrado nas culturas transfectadas com as proteínas mutadas. Esse efeito dominante negativo também foi observado por microscopia óptica com a expressão de DD-TcDLPK39A, como pode ser observado pela figura 51L.

Foi observada uma grande quantidade de células com este padrão, o que nos sugere que estes parasitas não são capazes de se dividir ou levam um tempo bastante prolongado para realizar a citocinese. É interessante notar que nestes parasitas, a ordem ou sequência de divisão das estruturas celulares não respeitam o descrito na literatura, já que o núcleo se dividiu antes do cinetoplasto. O padrão correto de divisão, onde o

cinetoplasto se divide antes da divisão nuclear, pode ser observado na figura 57.

Este painel e os 6 seguintes mostram parasitas com o fenótipo 2N1K.

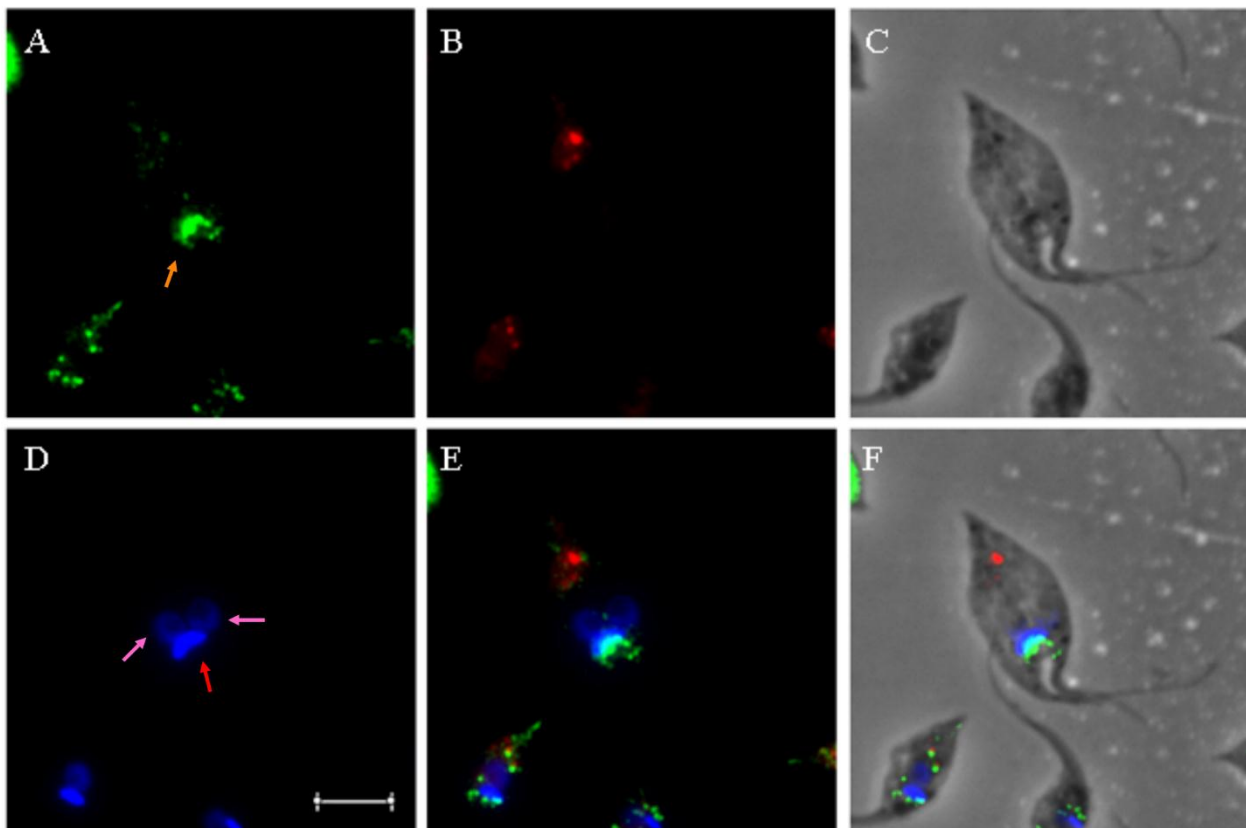


FIGURA 71 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 2). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta laranja indica a bolsa flagelar, a seta vermelha aponta o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

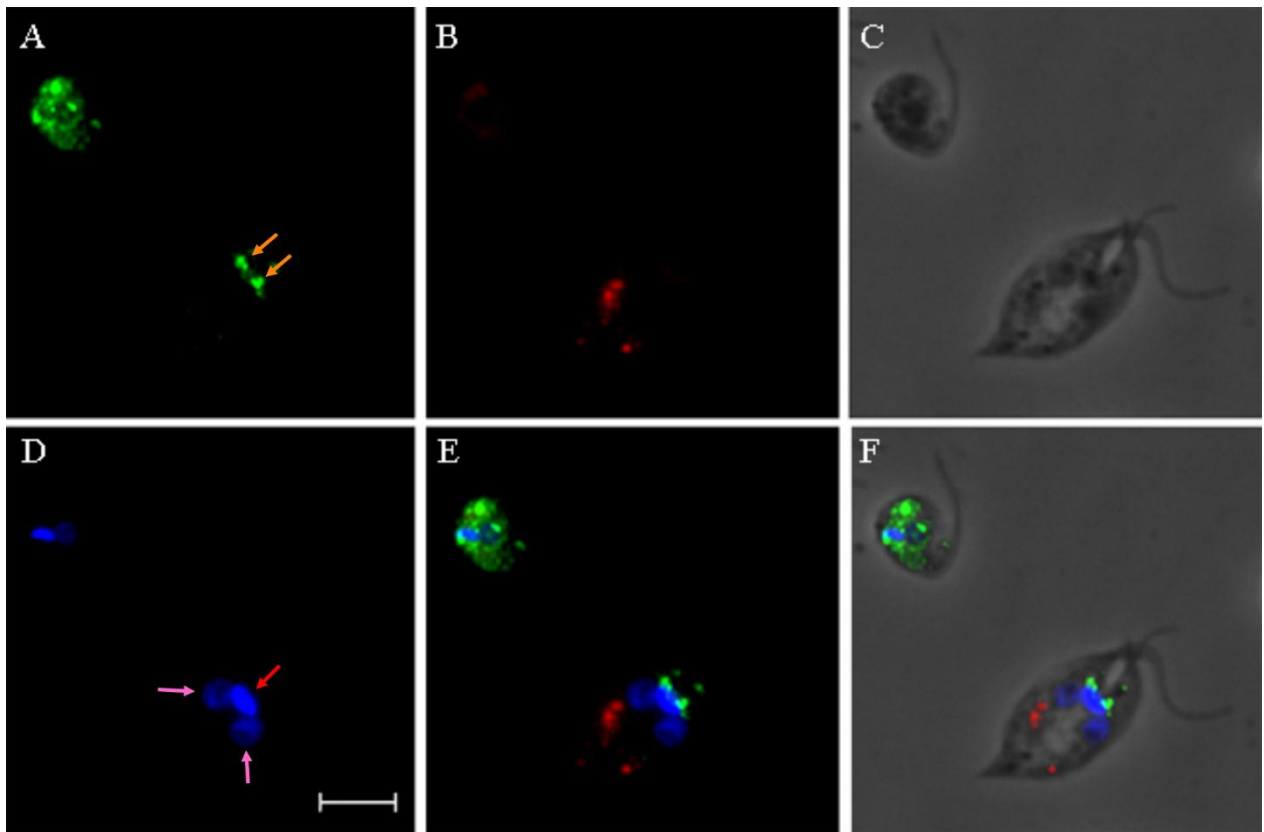


FIGURA 72 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 1). A) Detecção de TcDLP Δ L4-Flag utilizando anti-Flag e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucléicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. As setas laranjas indicam a bolsa flagelar, a seta vermelha aponta o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

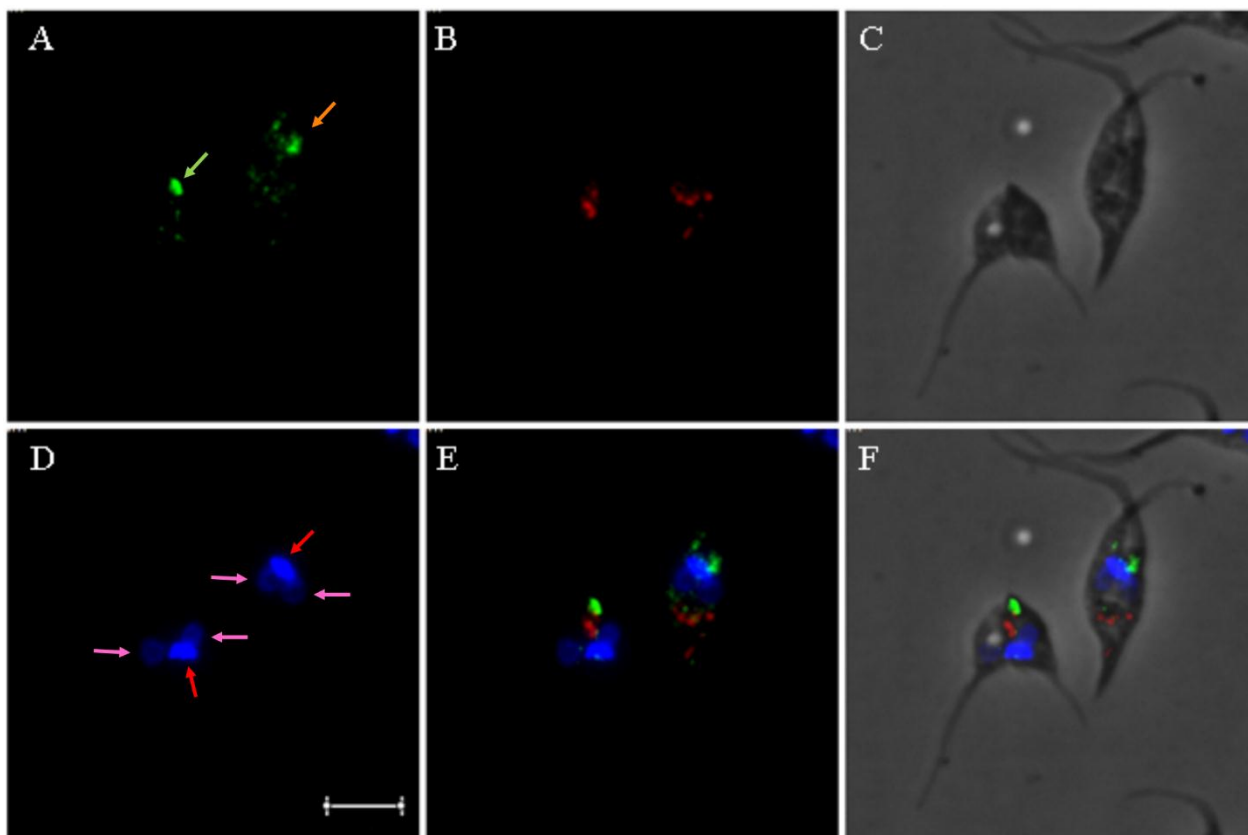


FIGURA 73 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 2). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLP Δ L4-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta laranja indica a bolsa flagelar, a seta verde indica a estrutura não identificada, as setas vermelhas apontam o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

Importante notar que o parasita em divisão à esquerda não apresenta a localização esperada da TcDLP majoritariamente na porção anterior do parasita, onde habitualmente está localizada a bolsa flagelar. Como indicada pela seta verde, esta estrutura se localiza na porção posterior.

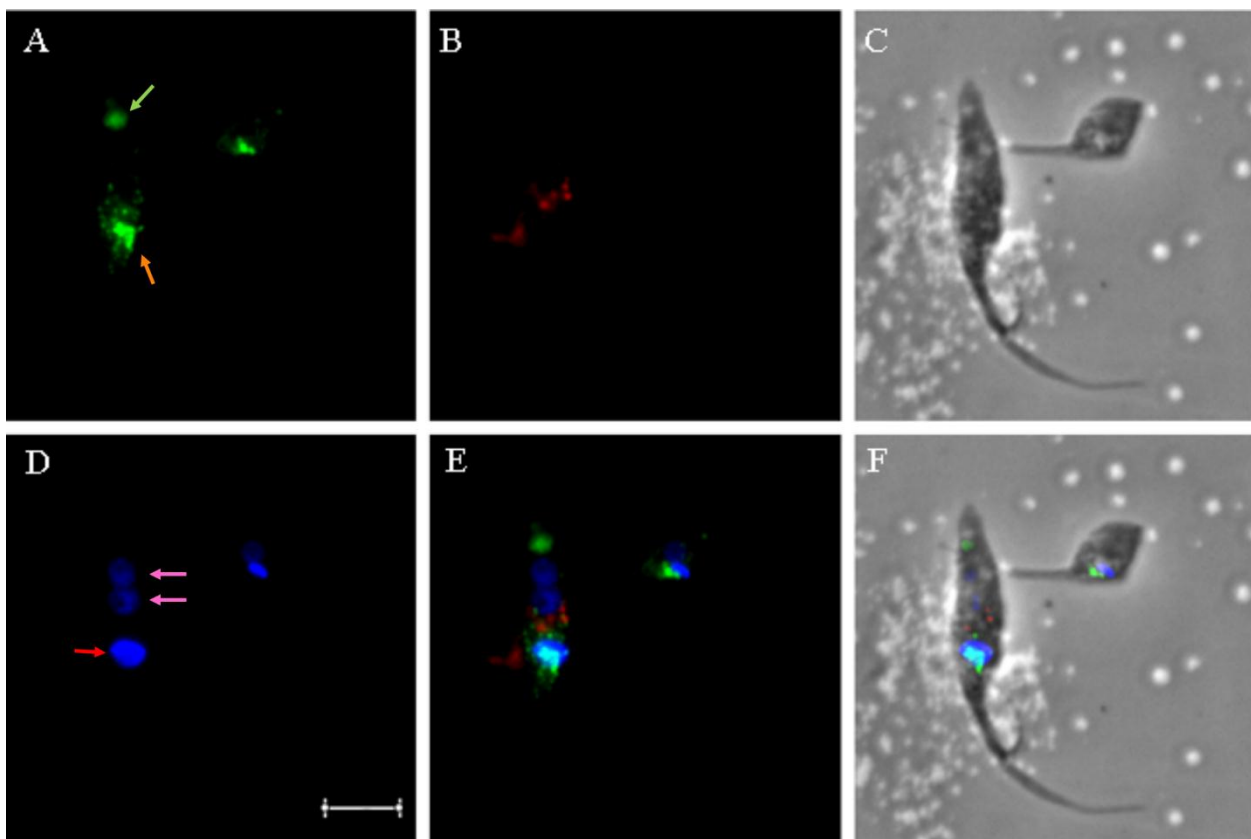


FIGURA 74 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A-HA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 1). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPK39A-HA utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta laranja indica a bolsa flagelar, a seta verde indica a estrutura não identificada, a seta vermelha aponta o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

O parasita em destaque neste painel, diferentemente dos apresentados anteriormente, apresenta dois núcleos localizados mais na porção posterior do parasitas. Podemos perceber pela localização da transferrina (B e E) que os reservossomos estão localizados entre os núcleos e o cinetoplasto e não mais na região posterior. Pode-se notar também, como na figura 73, uma forte marcação de TcDLP na região posterior (seta verde). Este parasita também tem dois flagelos, nos indicando que já está na fase G2 e apesar de o núcleo já ter se dividido o cinetoplasto permanece único.

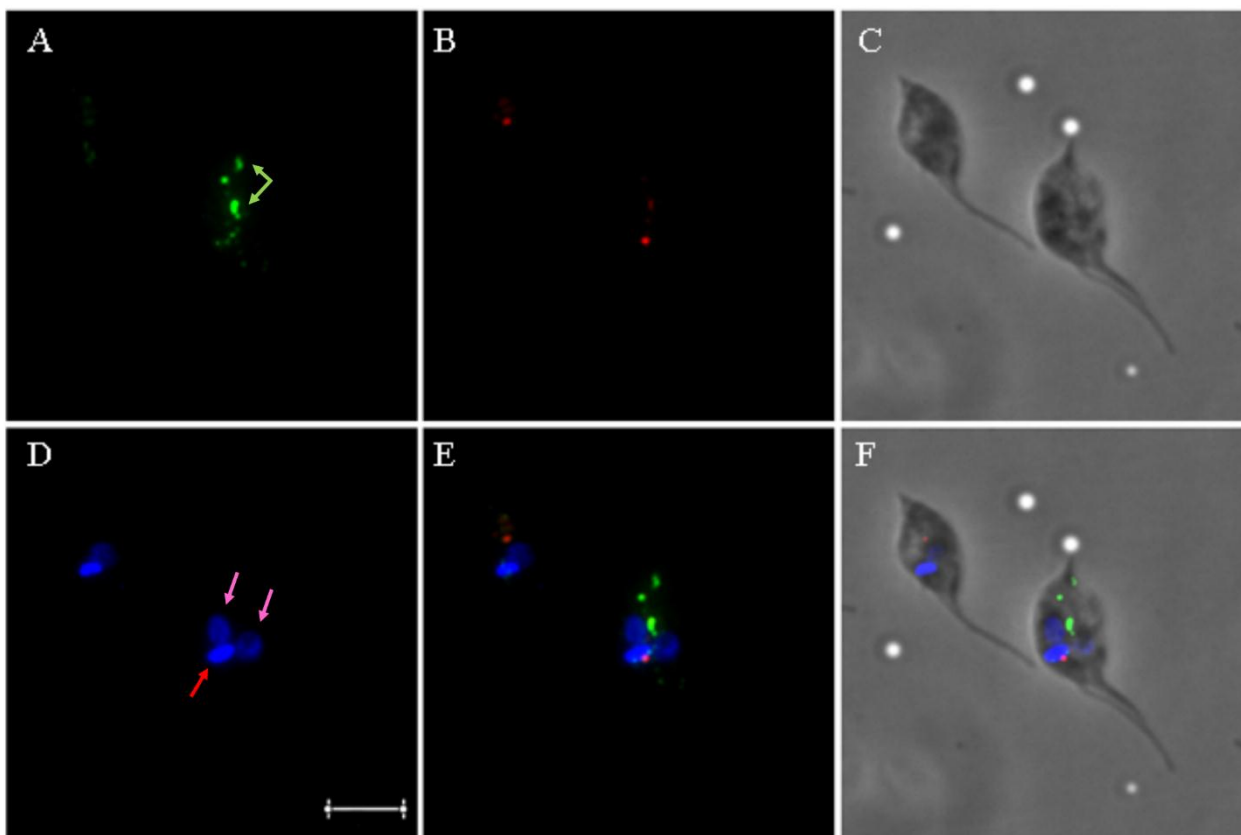


FIGURA 75 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A-HA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 2). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPK39A-HA utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. As setas verdes indicam a estrutura não identificada, a seta vermelha aponta o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

O parasita em destaque também apresenta uma localização majoritária de TcDLP na região posterior.

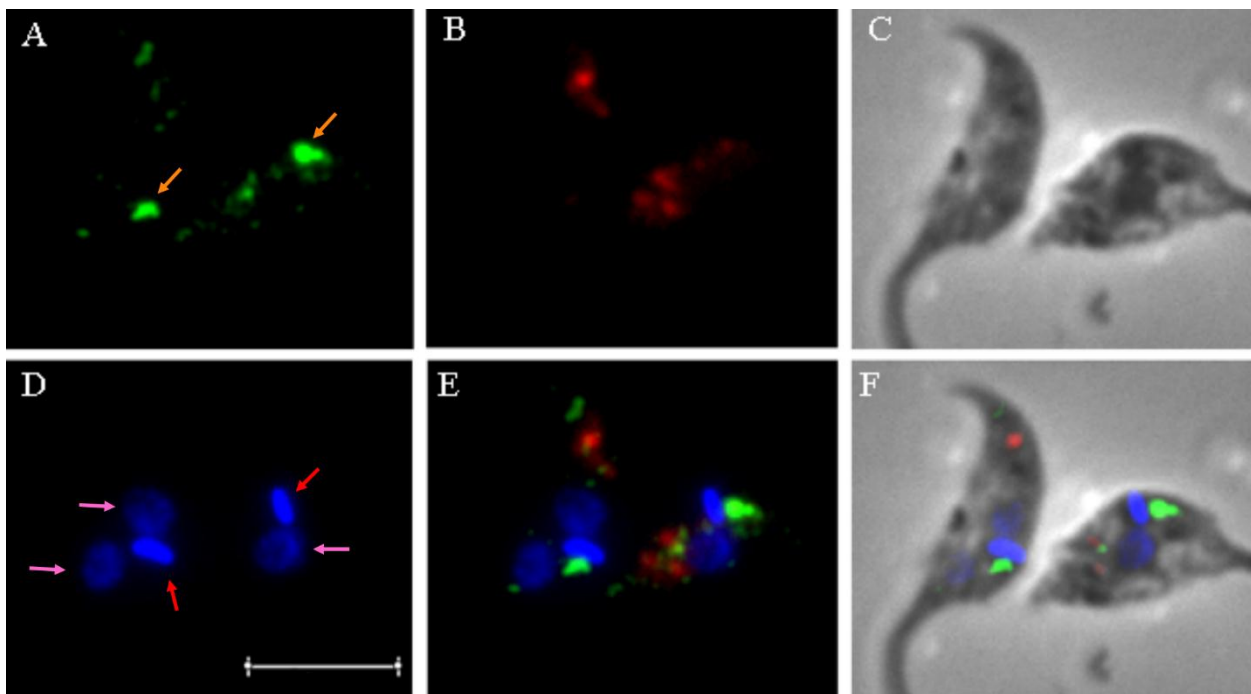


FIGURA 76 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A-HA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E UM CINETOPLASTO (PAINEL 3). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPK39A-HA utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. As setas laranjas indicam a bolsa flagelar, as setas vermelhas apontam o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

Os painéis seguintes mostram parasitas com o fenótipo 2N2K.

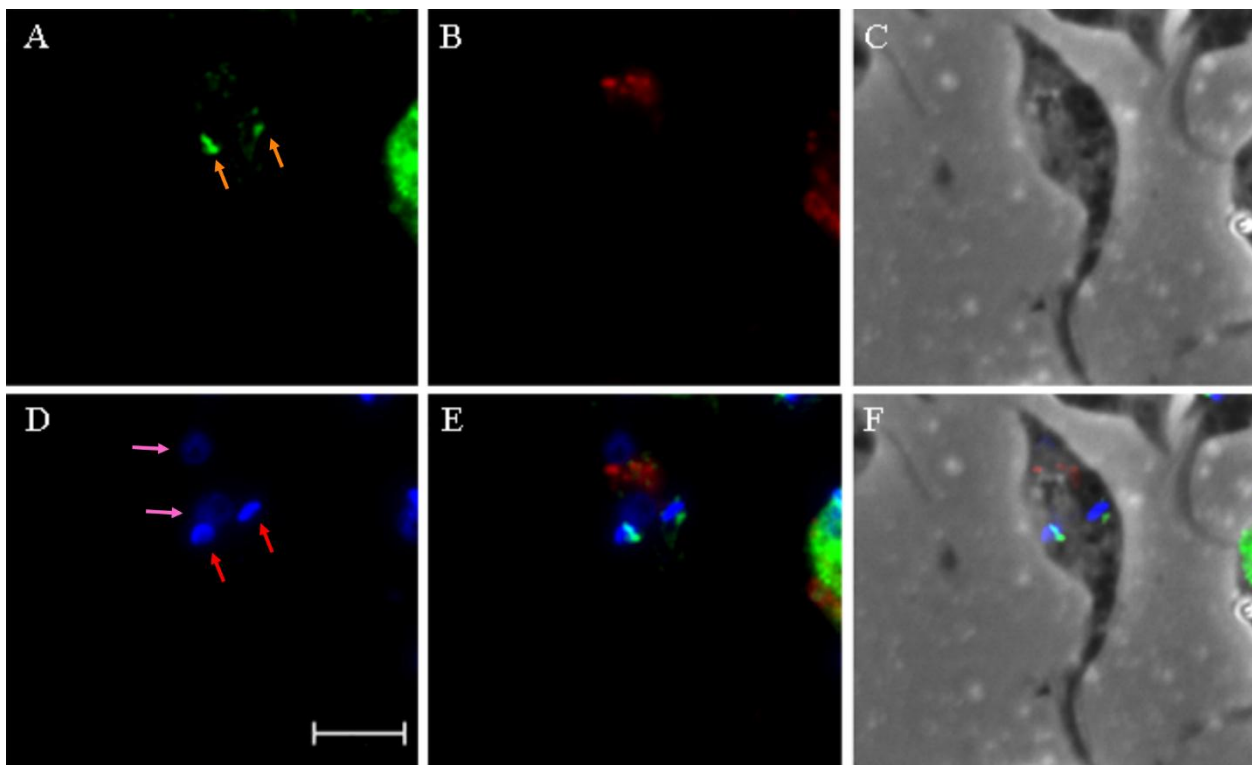


FIGURA 77 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E DOIS CINETOPLASTOS. A) Detecção de TcDLP endógena e de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAG utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucléicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. As setas laranjas indicam a bolsa flagelar, as setas vermelhas apontam o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

O parasita em destaque apresenta dois núcleos, sendo que um deles está localizado na região posterior. Esta célula também já tem duplicado o cinetoplasto. No entanto, aparentemente, não tem o segundo flagelo. Podemos perceber que o flagelo é mais largo do que o habitual.

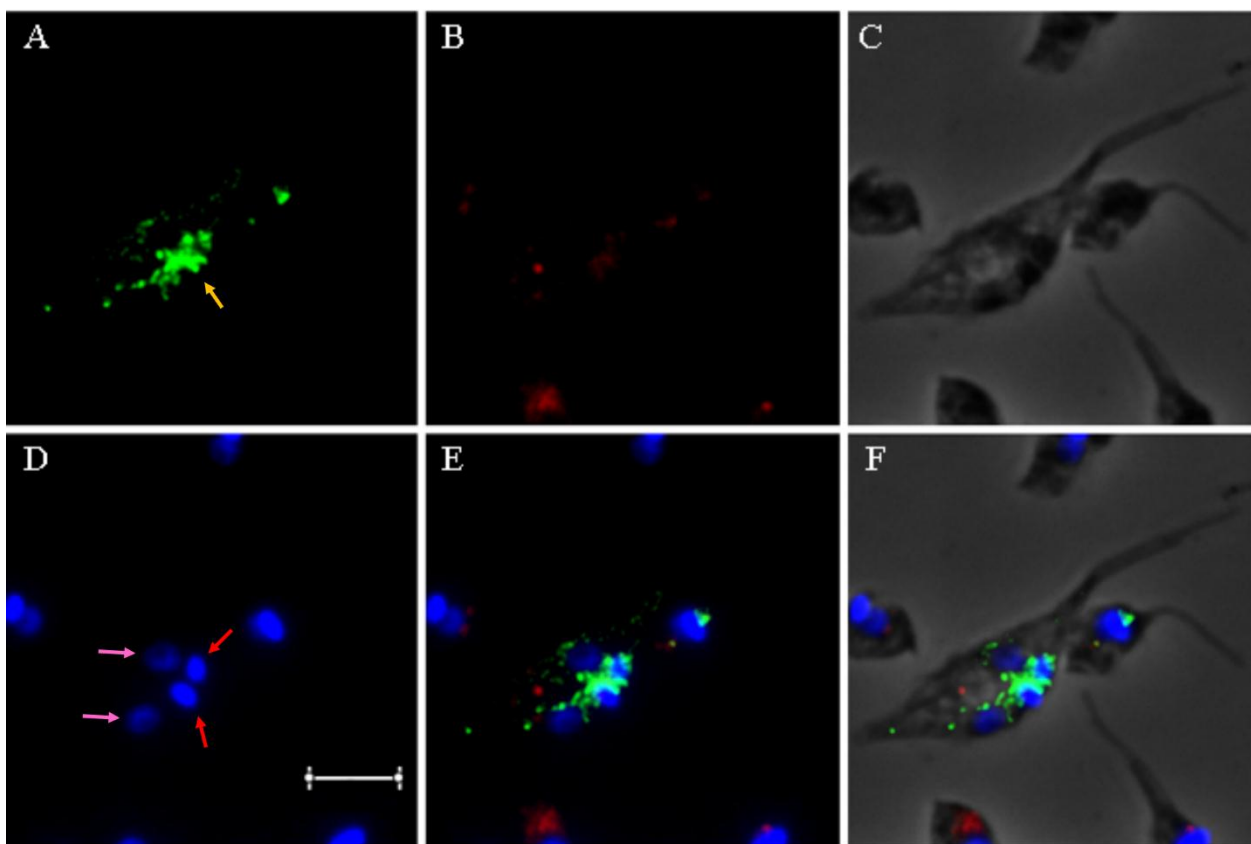


FIGURA 78 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E DOIS CINETOPLASTOS. A) Detecção de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-HA utilizando anti-HA e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta laranja indica a bolsa flagelar, as setas vermelhas apontam o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

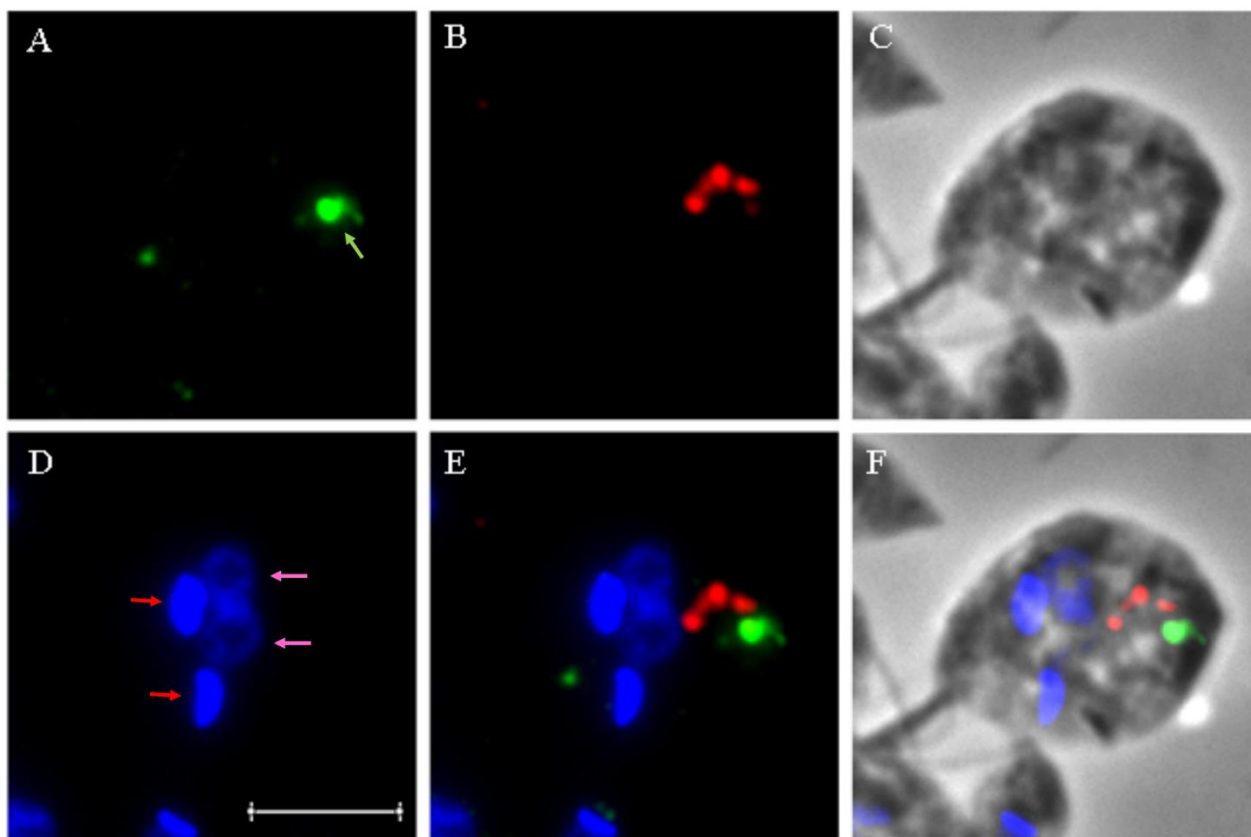


FIGURA 79 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPK39A-HA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E DOIS CINETOPLASTOS. A) Detecção de TcDLP endógena e de TcDLPK39A-HA utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta verde indica uma estrutura não identificada, as setas vermelhas apontas o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

Esta célula está com a morfologia bastante alterada. Novamente temos a marcação majoritária de TcDLP na região posterior.

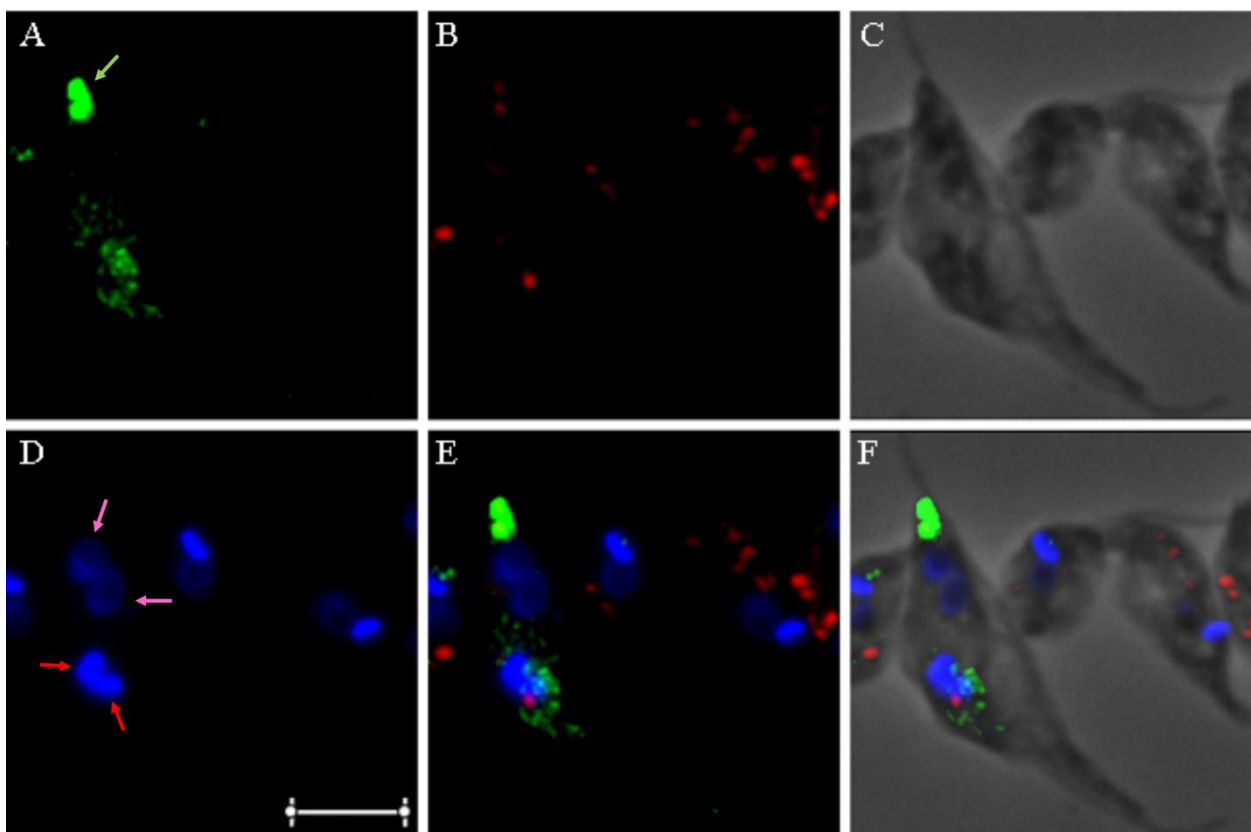


FIGURA 80 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA CONTENDO DOIS NÚCLEOS E DOIS CINETOPLASTOS. A) Detecção de TcDLP Δ L4-Flag utilizando anti-Flag e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta verde indica uma estrutura não identificada, as setas vermelhas apontam o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μ m.

Novamente observamos a marcação majoritária de TcDLP mutante na região posterior do parasita. Analisando a imagem em contraste de fase, parece que tem um flagelo surgindo desta região. Portanto, a região destacada com a seta verde poderia ser a região correspondente à bolsa flagelar. Pelos resultados obtidos no ensaio de endocitose também havíamos concluído de que esta marcação anômala poderia ser a bolsa flagelar por colocalizar com a transferrina (FIGURA 59A).

Microscopia eletrônica de transmissão seria uma alternativa para confirmar o que representa esta estrutura indicada pelas setas verdes nas figuras até aqui mostradas.

A figura a seguir mostra um parasita com o fenótipo 3N3K.

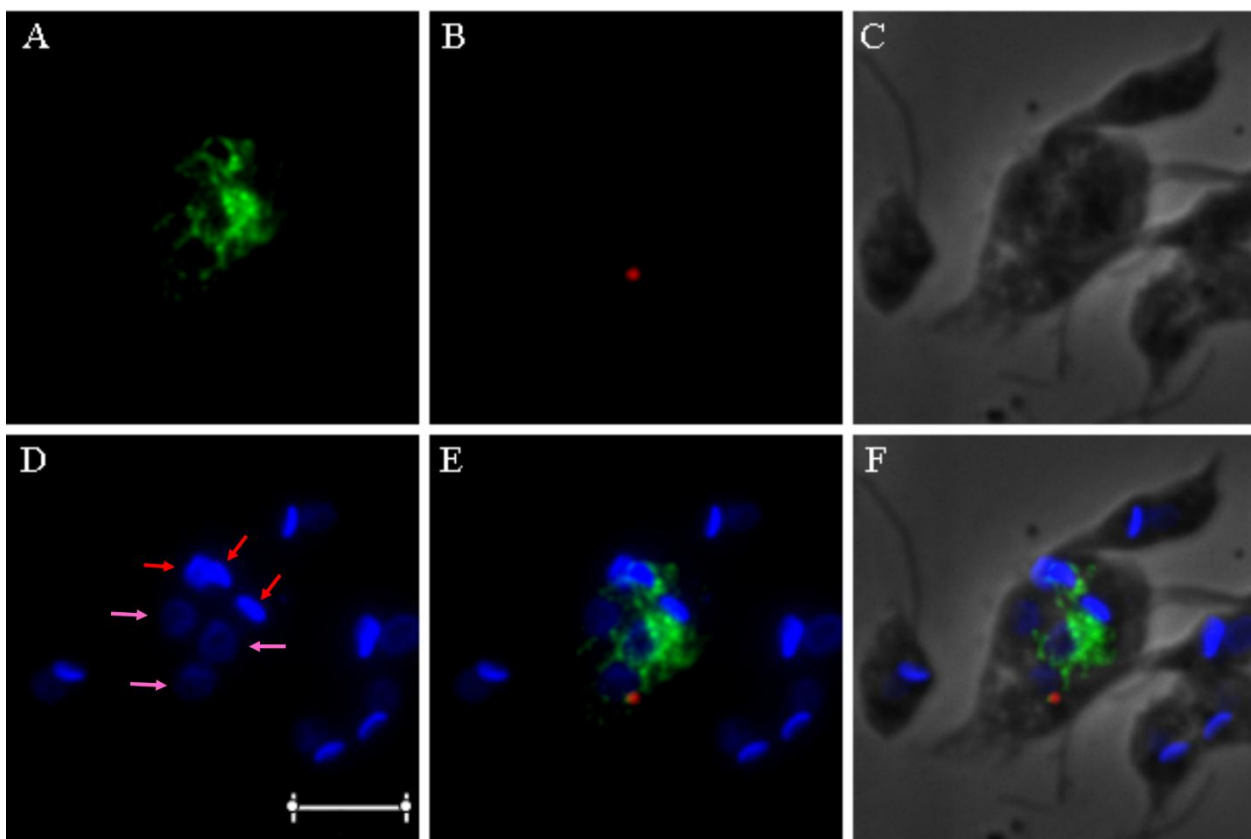


FIGURA 81 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAA/ΔL4-HA NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA MULTINUCLEADO. A) Detecção de TcDLPMAGMH391-AAAAA/ΔL4-HA utilizando anti-HA e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. As setas vermelhas apontam o cinetoplasto e as setas rosas, o núcleo. Barra = 5 μm.

Este fenótipo com múltiplos núcleos e cinetoplastos também foi observado por microscopia óptica nos parasitas expressando DD-TcDLPK39A, como observado na figura 52Q.

Com todos esses fenótipos observados nas culturas expressando as proteínas mutantes, fica cada vez mais sugestivo de que TcDLP tem alguma influência no ciclo celular do parasita.

Como citado anteriormente, existe uma controversa discussão sobre o papel da dinamina no processo de divisão celular. Ela teria participação na mitose, na citocinese ou em ambos?

Para ajudar esta discussão as figuras seguintes mostram parasitas contendo fragmentos de DNA que não se localizam no núcleo e nem no cinetoplasto.

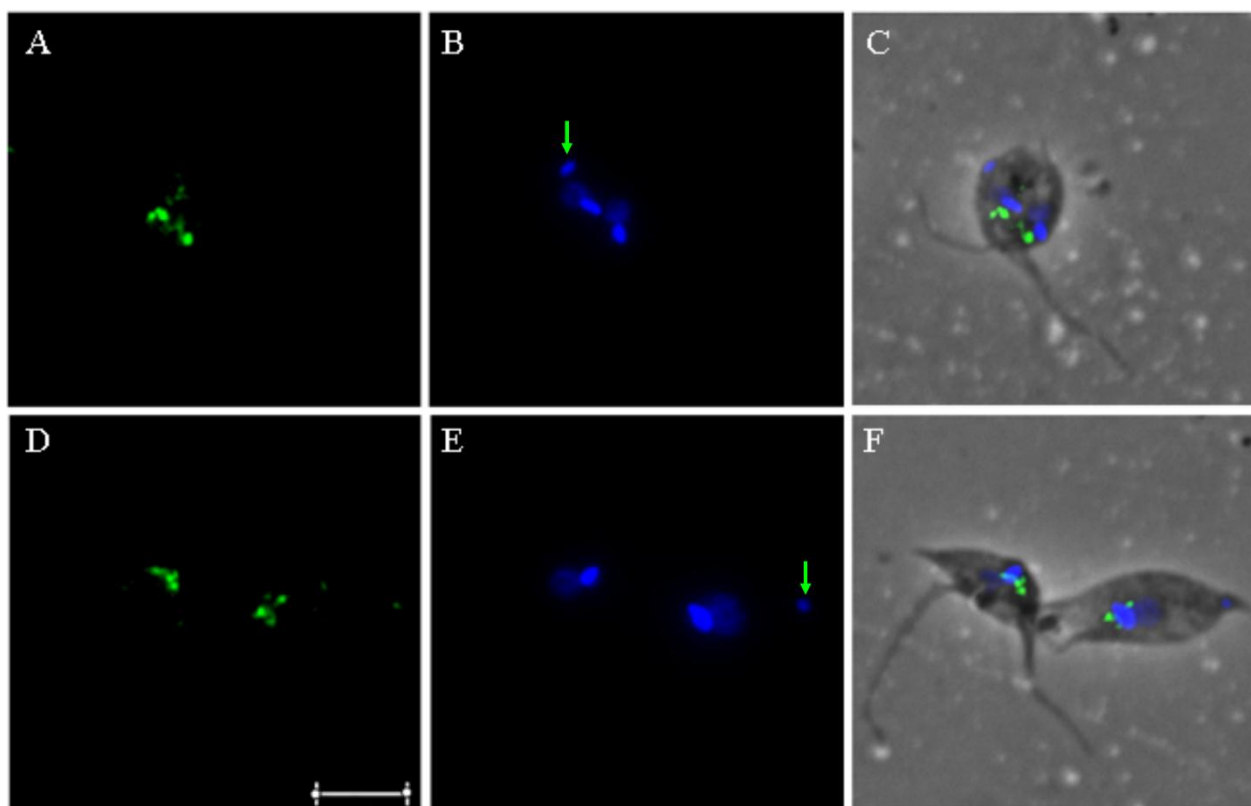


FIGURA 82 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITAS APRESENTANDO FRAGMENTOS DE DNA. A,D) Detecção TcDLP endógena e de TcDLPMAGMH391-395AAAAA/ Δ L4-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B,E) Marcação de ácidos nucléicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342. C,F) Contraste de fase com sobreposição das imagens anteriores. A seta em verde aponta o fragmento de DNA. Barra = 5 μ m.

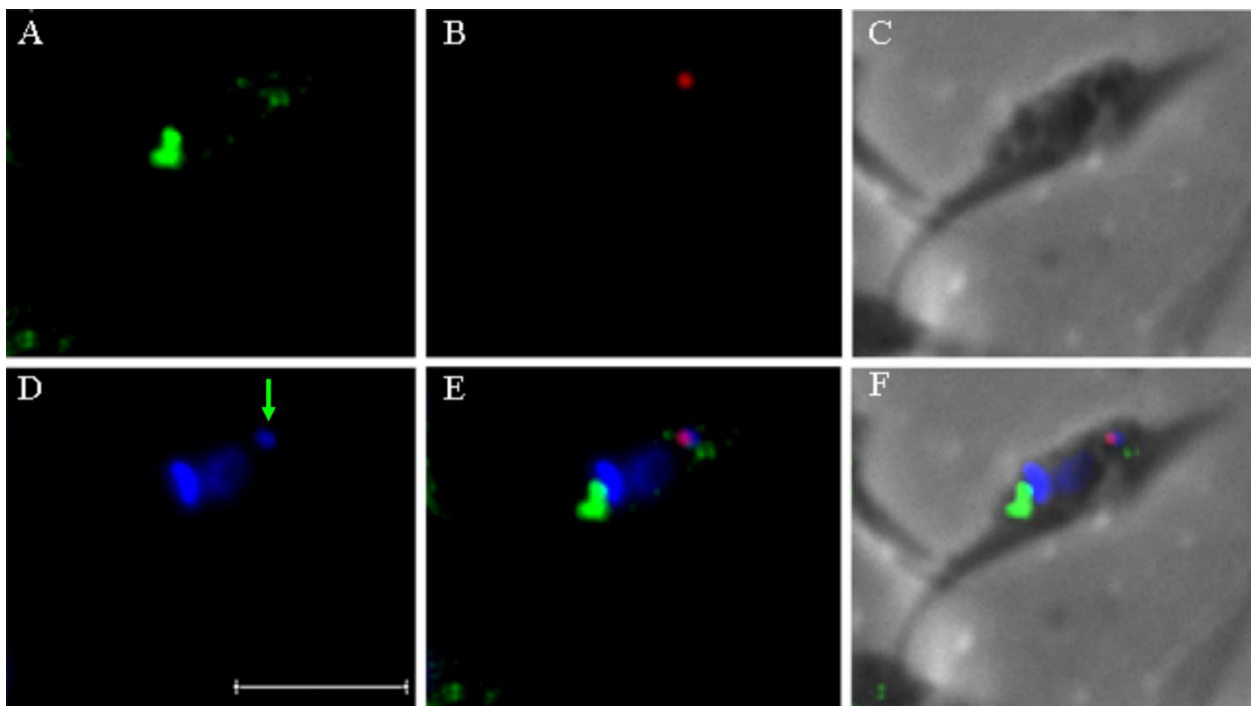


FIGURA 83 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLPAGMH391-395AAAAA-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA APRESENTANDO FRAGMENTO DE DNA. A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLPAGMH391-395AAAAA-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta em verde aponta o fragmento de DNA. Barra = 5 μ m.

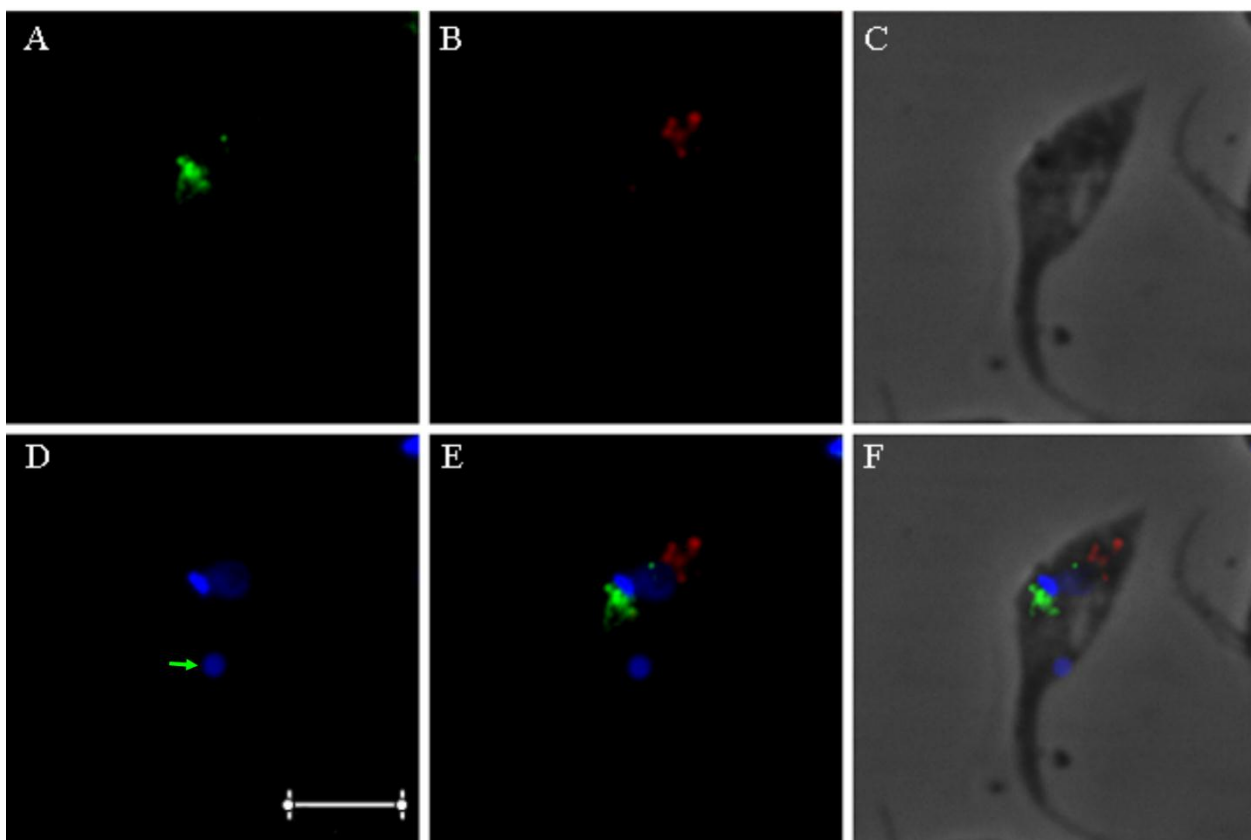


FIGURA 84 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA APRESENTANDO FRAGMENTO DE DNA (PAINEL 1). A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLP Δ L4-Flag utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta em verde aponta o fragmento de DNA. Barra = 5 μ m.

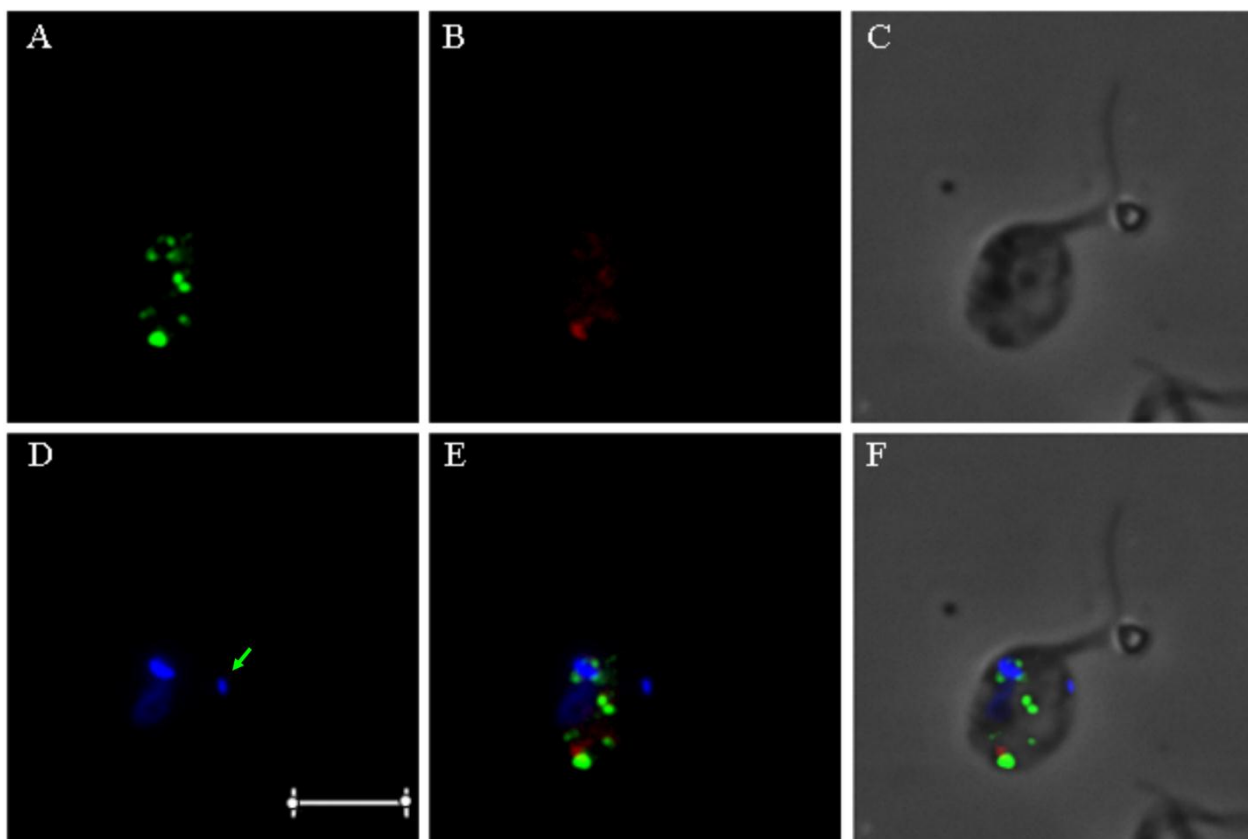


FIGURA 85 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITA APRESENTANDO FRAGMENTO DE DNA (PAINEL 2). A) Detecção de TcDLP Δ L4-Flag utilizando anti-Flag e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta em verde aponta o fragmento de DNA. Barra = 5 μ m.

Interessante notar que o fragmento de DNA está na grande maioria das vezes localizado na periferia, aparentemente junto à membrana celular.

Este efeito dominante negativo encontrado, nos faz pensar que TcDLP possa ter alguma participação na mitose. A regulação deste processo pode estar falhando pela expressão de TcDLP mutantes.

Embora, também seja provável que TcDLP participe da citocinese no *T. cruzi*. Como podemos observar nas figuras 86, 87 e 88.

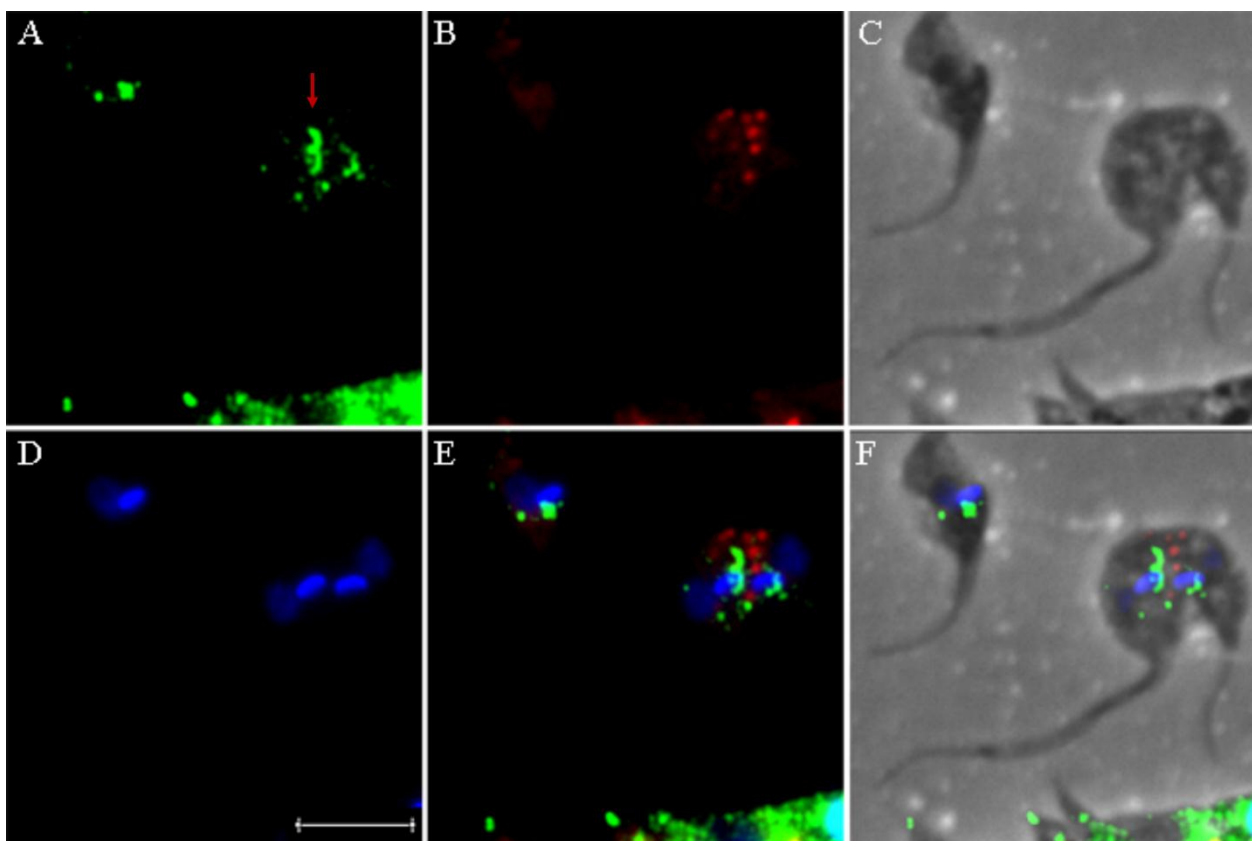


FIGURA 86 – PARTICIPAÇÃO DE TcDLP NA CITOCINESE DO *Trypanosoma cruzi* (PAINEL 1). Cultura de *T. cruzi* expressando TcDLP^{MAGMH391-395AAAAA/ΔL4-Flag}. A) Detecção de TcDLP endógena e TcDLP^{MAGMH391-395AAAAA/ΔL4-Flag} utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta em vermelho aponta para uma estrutura em forma de meio anel. Barra = 5 μm.

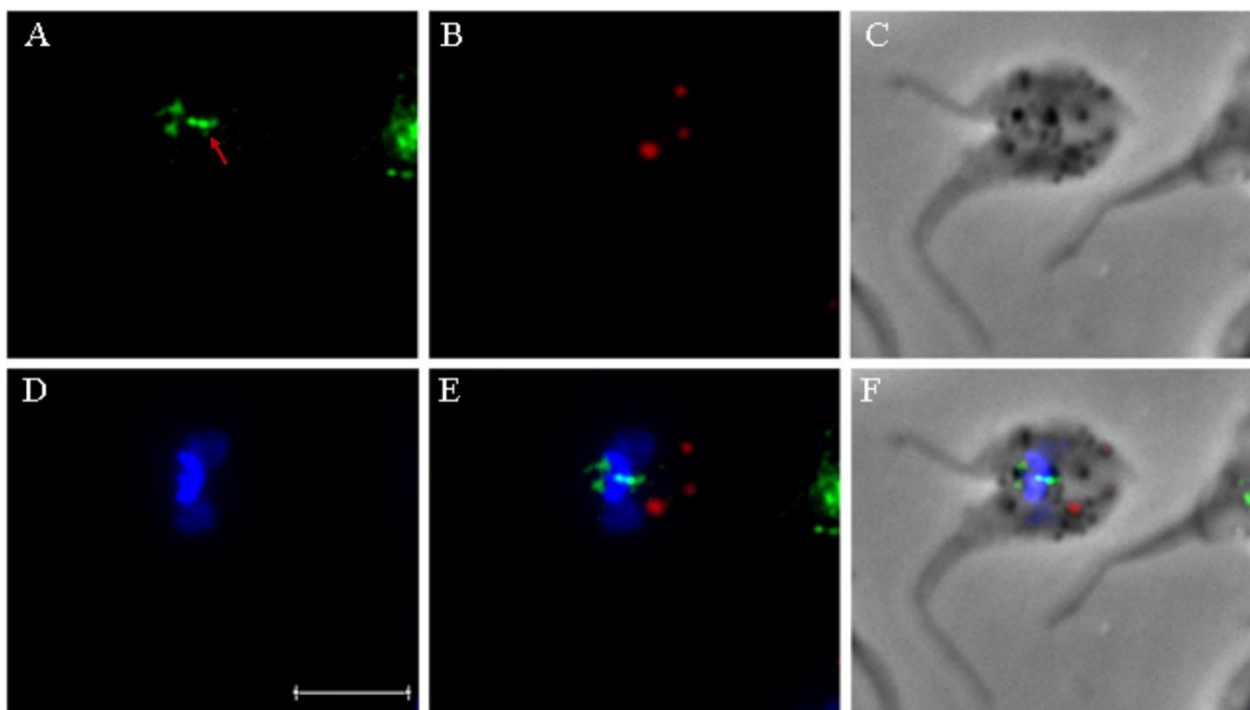


FIGURA 87 – PARTICIPAÇÃO DE TcDLP NA CITOCINESE DO *Trypanosoma cruzi* (PAINEL 2). Cultura de *T. cruzi* expressando TcDLPMAGMH391-395AAAAA-Flag. A) Detecção de TcDLPMAGMH391-395AAAAA-Flag utilizando anti-Flag e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta em vermelho aponta para uma estrutura em forma de meio anel. Barra = 5 μ m.

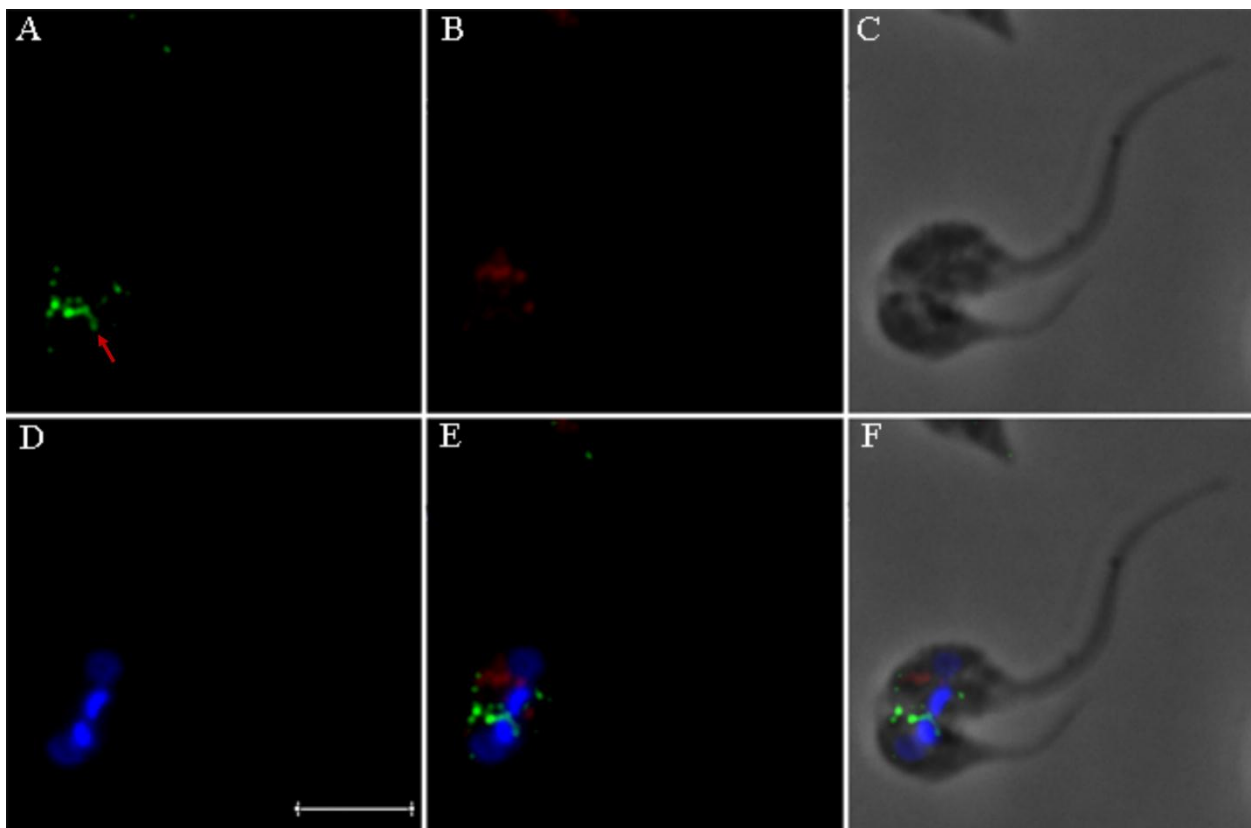


FIGURA 88 – PARTICIPAÇÃO DE TcDLP NA CITOCINESE DO *Trypanosoma cruzi* (PAINEL 3). Cultura de *T. cruzi* expressando TcDLPMAGMH391-395AAAAA-HA. A) Detecção de TcDLP endógena e de TcDLPMAGMH391-395AAAAA-HA utilizando anti-TcDLP e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. B) Localização da transferrina acoplada a AlexaFluor 633. C) Contraste de fase. D) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342, E) Sobreposição das imagens A, B e D. F) Sobreposição de C e E. A seta em vermelho aponta para uma estrutura em forma de meio anel. Barra = 5 μ m.

Estas últimas três figuras mostram uma estrutura (indicada pelas setas vermelhas) contínua em forma de meio anel em parasitas que estão se dividindo. Este resultado é bastante interessante e nos dá um forte indício de que TcDLP possa estar atuando na citocinese do parasita *T. cruzi*.

Foram também observadas outras alterações celulares, tais como parasitas com cinetoplastos arredondados (Figura 89).

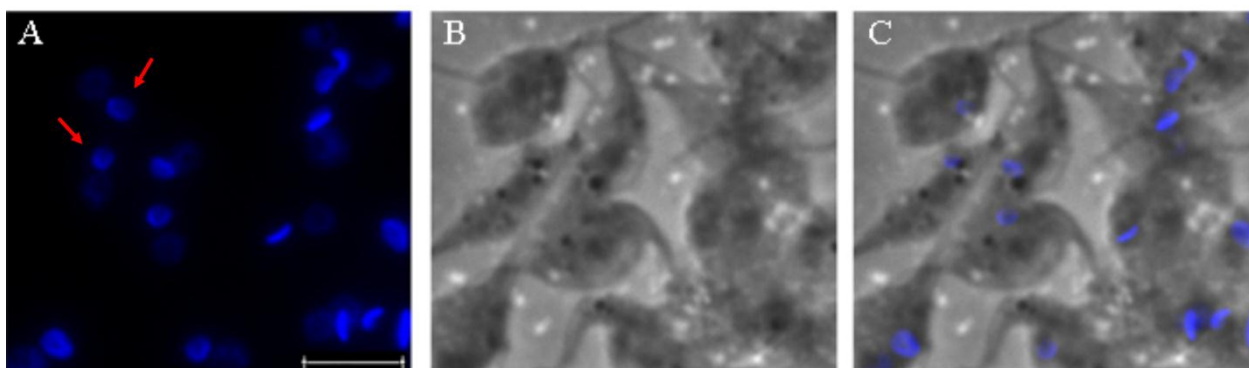


FIGURA 89 – EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DA EXPRESSÃO DE TcDLP Δ L4-FLAG NO *Trypanosoma cruzi* VISUALIZADO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA – PARASITAS APRESENTANDO CINETOPLASTOS ARREDONDADOS. A) Marcação de ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) com Hoechst 33342. B) Contraste de fase. C) Sobreposição das imagens anteriores. As setas vermelhas indicam o cinetoplasto. Barra = 5 μ m.

Este fenótipo em que os cinetoplastos estão mais arredondados e menos condensados pode ser visualizado por microscopia óptica na figura 52N, onde mostramos o efeito dominante negativo da expressão de DD-TcDLPK39A.

Com todos estes resultados apresentados existe um forte indício de que TcDLP atua na endocitose e tem participação no ciclo celular (mitose e/ou citocinese) do parasita *T. cruzi*. Segundo Chanez *et al.* (2006) TbDLP tem participação na endocitose, citocinese e fissão mitocondrial. Pela grande similaridade entre as proteínas TcDLP e TbDLP é bastante sugestivo de que a DLP do *Trypanosoma cruzi* também tenha participação na divisão mitocondrial. Além disso, expressão de DD-TcDLPK39A resultou em parasitas com mitôcondrias aumentadas. Para suportar ainda mais esta hipótese a figura 90 mostra a localização de TcDLP em linhas pontuais que provavelmente represente sua localização na mitocôndria.

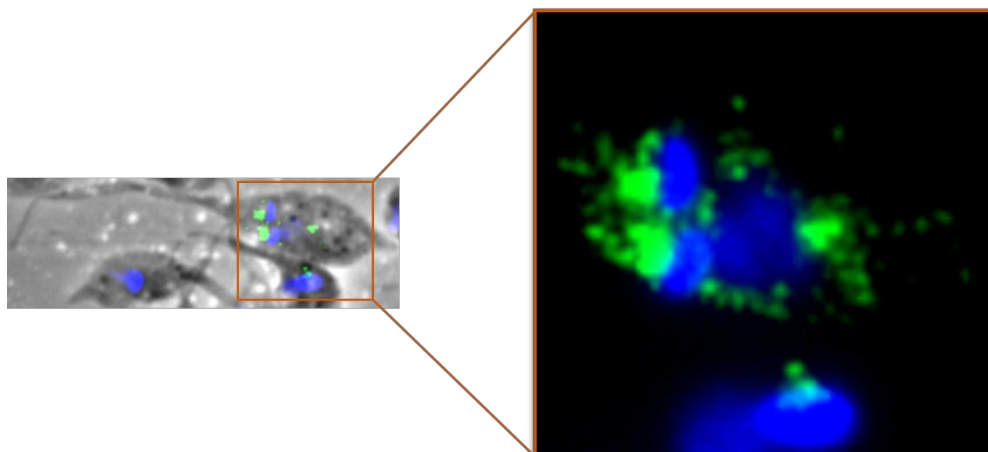


FIGURA 90 – PARTICIPAÇÃO DE TcDLP NA DIVISÃO MITOCONDRIAL. *T. cruzi* expressando TcDLPK39A-HA. Em verde, detecção de TcDLPK39A-HA utilizando anti-HA e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488.

5 DISCUSSÃO

A proteína dinamina pertence a uma crescente família de GTPases de grande massa molecular. Os membros dessa família estão envolvidos em diversos processos celulares que vão da biogênese de vesículas de transporte à divisão e fusão de organelas (revisto por Ramachandran, 2011) ou seja, estas proteínas parecem estar envolvidas em um grande subconjunto de reações intracelulares que envolvem uma grande remodelagem de membranas.

Com base em características estruturais comuns e características funcionais globais, a superfamília das dinaminas pode ser subdividida em dinaminas clássicas e dinaminas não clássicas (*dynammin-like proteins* - DLPs ou *dynammin-related proteins* - DRPs). As dinaminas clássicas se distinguem das DLPs pela presença de cinco domínios distintos: (1) um grande domínio GTPase N-terminal, (2) um domínio central envolvido na automontagem e na polimerização, (3) o domínio PH que se liga a fosfoinositídeos de membrana, (4) um domínio efetor de GTPase (GED) que também participa da automontagem e na regulação da atividade GTPase e (5) um domínio C-terminal rico em prolina e arginina (PRD) que se liga ao domínio SH3 de proteínas acessório. Essas proteínas funcionam como alvo para levar a dinamina para os mais variados locais de atuação (revisto por Ramachandran, 2011).

As DLPs não possuem o domínio PH e o domínio PRD. No entanto possuem outros motivos que conferem a especificidade destas proteínas e por isso podem atuar em diferentes processos celulares (PRAEFCKE; MCMAHON, 2004).

A dinamina identificada neste trabalho como TcDLP, parece ser o único membro dessa família presente em *T. cruzi*, diferentemente de outros organismos tais como *Toxoplasma gondii*, que possui três dinaminas DrpA, DrpB e DrpC (BREINICH *et al.*, 2009); e *Dictyostelium discoideum* com cinco DLPs: DymA, DymB, DlpA, DlpB e DlpC (MASUD RANA *et al.*, 2013). A proteína ortóloga de TcDLP no tripanosomatídeo *T. brucei*, TbDLP, já foi caracterizada e também parece ser a única dinamina presente neste parasita (CHANEZ *et al.*, 2006).

É bastante interessante e oportuno estudar e caracterizar uma proteína pertencente a uma superfamília tão extensa, complexa, com diversas particularidades e que é única em um organismo tão complexo como *T. cruzi*.

O primeiro passo para a caracterização da TcDLP começou pela análise da sequência da proteína alinhando com uma dinamina clássica já muito bem caracterizada, a hsDinamina1. Para essa análise e posteriores ensaios foi imprescindível a colaboração da Dra. Katja Faelber e do Professor Dr. Oliver Daumke, ambos do Max-Delbrueck Centrum localizado em Berlim, Alemanha. Com esta análise conseguimos, primeiramente, concluir que realmente se tratava de uma DLP e, também, definir alguns aminoácidos críticos importantes para a função da dinamina, os quais foram mutados e verificados seus efeitos de dominância negativa *in vivo*. Essas análises foram importantes para se obter a proteína purificada em larga escala, já que também gostaríamos de encontrar uma molécula que inibisse a atividade GTPásica de TcDLP por triagem de uma biblioteca de 30.000 pequenos compostos. Voltaremos a falar sobre o ensaio de efeito de dominância negativa mais adiante.

O resultado do alinhamento com outras dinaminas, mostrou que TcDLP compartilha apenas (30%) de identidade com a hsDinamina1. Esse resultado era esperado, já que TcDLP não possui os domínios PH e o domínio PRD encontrados na hsDinamina1. No entanto, pelo alinhamento da estrutura secundária podemos prever que TcDLP possui o mesmo arranjo estrutural da hsDinamina1 e de outros membros dessa superfamília.

Também pelo alinhamento de TcDLP com hsDinamina1 podemos observar que o domínio G é o mais conservado. Quando alinhamos os motivos deste domínio importantes para a atividade GTPásica de TcDLP com diversos outros organismos, verificamos que os aminoácidos críticos são conservados. Esta análise corrobora com o resultado obtido no ensaio de hidrólise de GTP, em que TcDLP é capaz de hidrolisar GTP em GDP e Pi (fosfato inorgânico). Segundo Fröhlich *et al.* (2013), a taxa basal de hidrólise de GTP da proteína DNM1L (de *Dynamin 1-like protein*) é semelhante à taxa basal da proteína DNML1 mutada (4A + ΔB). Estas mutações são as mesmas que foram inseridas na proteína purificada utilizada no ensaio de GTPase, TcDLPMAGMH391-395AAAA/ΔL4. Portanto, a K_{obs} de 19 min^{-1} observado para a TcDLPMAGMH391-395AAAA/ΔL4 pode ser extrapolado para a TcDLP.

Este e outros ensaios *in vitro*, tais como o ensaio de cosedimentação de lipossomos mostraram que TcDLP conserva as principais características bioquímicas e biofísicas dos membros dessa família. Não foi possível verificar a tubulação de lipossomos pela TcDLP, pois ao que parece TcDLP é bastante eficiente na fissão e rapidamente transforma os lipossomos em debris. Esta pode ser uma explicação para a aparente dificuldade em se encontrar vesículas brotando dos compartimentos especializados no processo endocítico e tráfego de membranas, tais como o complexo citóstoma/citofaringe e a bolsa flagelar, no *T. cruzi*. Esta característica pode, portanto, ser de crucial importância para a sobrevivência do parasita em ambientes hosts.

Apesar de não termos conseguido ver a tubulação de lipossomos, encontramos estruturas em formas de anéis de TcDLP, como descrito para outras dinaminas (SMIRNOVA *et al.*, 2001; KLOCKOW, 2002).

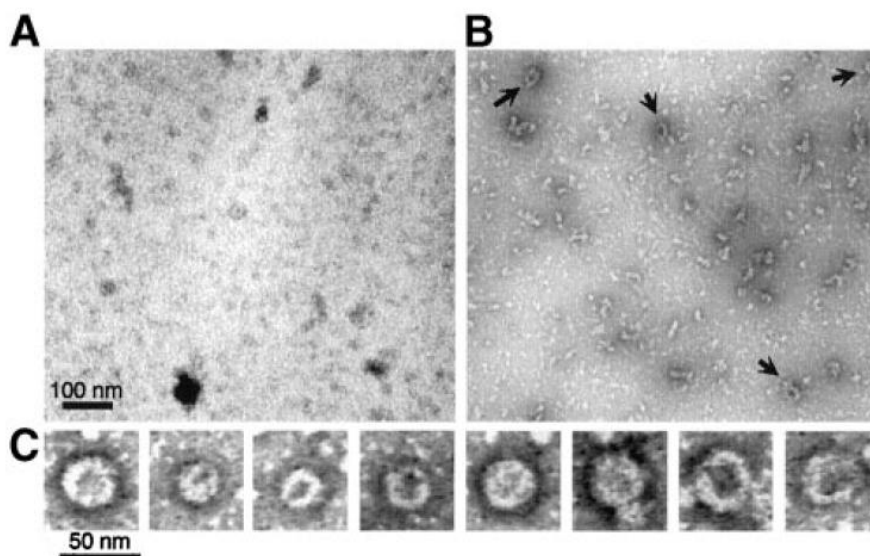


FIGURA 91 – FORMAÇÃO DE ESTRUTURAS EM FORMA DE ANÉIS *IN VITRO* DA PROTEÍNA PURIFICADA Drp1. Drp1 é um membro da superfamília das dinaminas em humanos e participa da divisão mitocondrial. A) Microscopia eletrônica de Drp1 incubada com NaCl 150 mM. B) Drp1 incubada com GDP e AlF_4^- . As setas apontam as estruturas em forma de anel. C) Exemplo de estruturas em forma de anéis encontradas. As proteínas foram detectadas por contração negativa utilizando acetato de uranila. FONTE: Smirnova *et al.* (2001).

Esta capacidade de se complexar na forma de anéis *in vitro* indica que TcDLP pode formar estruturas necessárias (anéis ou espirais) para sua função celular de constrição de membranas.

Ensaio de localização subcelular de TcDLP nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclico, por imunofluorescência indireta, mostraram que a proteína está presente majoritariamente na região que corresponde à bolsa flagelar. Nessa região também se localiza o complexo de Golgi. Segundo Sant'Anna *et al.* (2004), vesículas revestidas por clatrina são liberadas do complexo de Golgi. Portanto, é bem provável que TcDLP também participe nesse processo.

Nas formas epimastigotas também foi possível identificar a TcDLP no citóstoma. Esta estrutura não está presente na forma tripomastigota metacíclica, mas é de grande importância para o processo de endocitose das formas epimastigotas. Análise quantitativa da ingestão de macromoléculas acopladas a ouro coloidal mostrou que nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, cerca de 85% das partículas de ouro estão associadas ao citóstoma (PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000).

A localização da TcDLP nas regiões especializadas nos endocíticos e/ou secretórios em *T. cruzi* sugere que TcDLP participa do processo de endocitose no parasita, resultado este corroborado pelos ensaios de endocitose por captação de transferrina. Curiosamente observamos colocalização parcial de TcDLP mutante (TcDLPMAGMH391-395AAAA/ Δ L4-HA) com a transferrina depositada nos reservossomos. Esse resultado nos levou a hipótese de que TcDLP possa participar do tráfego de vesículas que acontece na região posterior do parasita, onde a rede de túbulos e vesículas direcionam ao reservossomos as moléculas endocitadas (FIGURA 92).

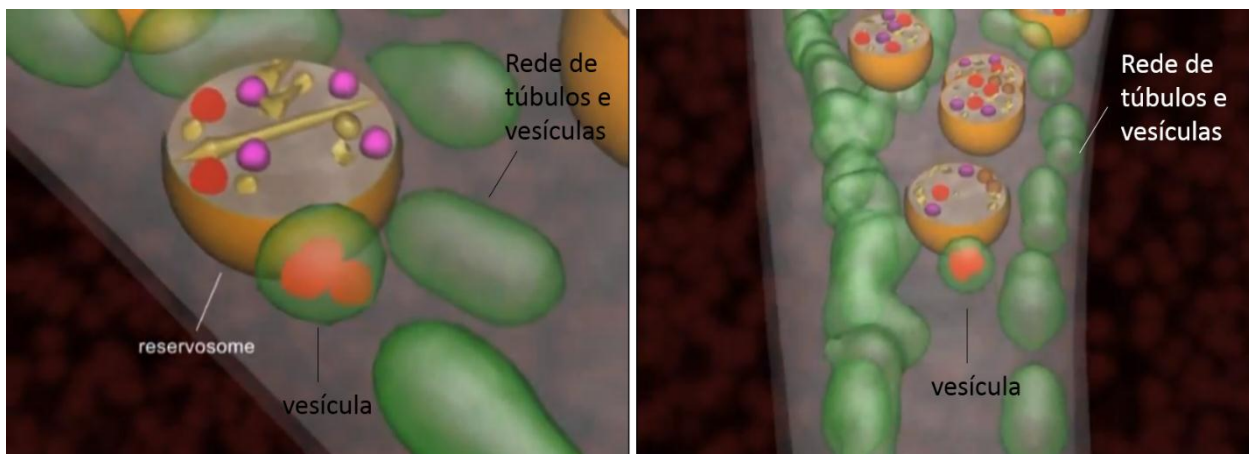


FIGURA 92 – REDE DE TÚBULOS E VESÍCULAS QUE DIRECIONAM AS MOLÉCULAS ENDOCITADAS AO RESERVOSSOMO ATRAVÉS DE VESÍCULAS.

FONTE: retirado do vídeo “*Animation of the endocytic process in the epimastigote form of T. cruzi*”. Produzido por Dirceu Esdras Teixeira, Merlene Benchimol, Wanderley de Souza e Paul Crepaldi.

Quando verificamos a expressão de TcDLP durante o ciclo de vida do parasita por ensaios de western blot, observamos que a proteína é expressa na quatro principais formas: epimastigota, tripomastigota metacíclica, amastigota e tripomastigota sanguíneo, sugerindo que TcDLP seja necessária durante todo o ciclo de vida. Segundo De Souza (2009a), a endocitose acontece somente nas formas epimastigotas, as quais são encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado e em culturas axênicas, sendo pouca ou ausente nas formas tripomastigotas metacíclica e sanguínea e na formas amastigotas. Portanto, a expressão de TcDLP durante todo o ciclo de vida do *T. cruzi* pode ser uma indicação de que a dinamina esteja participando de outros eventos celulares, além da endocitose.

Com o objetivo de avaliar em quais processos celulares TcDLP estaria envolvida seguimos com duas estratégias: o nocaute gênico e o efeito de dominância negativa.

O nocaute gênico é uma técnica em que o gene de interesse é inativado pela inserção de um marcador através do processo de recombinação homóloga, de tal forma que o organismo não mais produza a proteína de interesse. Desta forma, pode-se avaliar as alterações provocadas pela falta da proteína no organismo em estudo e, assim, inferir funções a esta. Porém, no nosso caso, não foi possível inferir funções à TcDLP utilizando esta estratégia, pois não obtivemos parasitas nocaute viáveis. *Trypanosoma cruzi*, por ser um organismo diplóide, é preciso que o gene seja nocauteado nos dois alelos. No

entanto, somente conseguimos parasitas simples nocaute, onde apenas um dos alelos do gene *Tcdlp* foi nocauteado. Este resultado sugere que TcDLP é essencial para o *T. cruzi*.

A outra estratégia utilizada com o objetivo de avaliar a função de TcDLP foi o efeito de dominância negativa. Para este ensaio ser bem sucedido é preciso conhecer bem a arquitetura da proteína, sendo importante inserir mutações em regiões críticas, de modo a garantir que a proteína não seja funcional, mas mantenha sua estrutura.

Neste trabalho, o efeito dominante negativo foi realizado com três mutações: a mutação K39A, a mutação MAGMH391-395AAAAA e a mutação Δ L4.

A mutação K39A está localizada no domínio G, mais especificamente no motivo G1 ou P-loop. Essa mutação foi descrita pela primeira vez em 1994, onde foi mostrado que a dinamina participa na formação de vesículas revestidas (DAMKE *et al.*, 1994) e vem sendo utilizada até os dias de hoje.

O resíduo de lisina K44 da hsDinamina1 corresponde ao resíduo de lisina K39 da TcDLP. Com já citado anteriormente, este resíduo presente no P-loop contribui para a compensação de cargas, coordenando os grupamentos fosfato β e γ do nucleotídeo. A mutação deste resíduo de lisina leva à perda da capacidade dessas proteínas de ligar e hidrolisar GTP. Mutações no P-loop embora levem a alterações da atividade GTPásica, não interferem na capacidade do domínio G de formar dímeros e se oligomerizar (CHAPPIE *et al.*, 2010; BRAMKAMP, 2012). No entanto, a hidrólise de GTP é essencial para que ocorra a constrição e, assim, a cisão da vesícula (SWEITZER; HINSHAW, 1998; MARKS *et al.*, 2001; ROUX *et al.*, 2006; FAELBER *et al.*, 2012).

As mutações que mantêm a dinamina humana como dímero estável foram identificadas em 2007 por Ramachandran e colaboradores, que mostraram que as mutações R361A e R399A no domínio central impedem que a proteína forme tetrâmeros e consequentemente se tornem incapazes de se oligomerizar, permanecendo como dímeros estáveis.

Recentemente foi mostrado que mutações em um loop altamente conservado localizado na extremidade da região de haste interferem com a oligomerização da hsDinamina1, MxA e DNM1L (GAO *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2011; FAELBER *et al.*, 2011; FORD *et al.*, 2011, FRÖHLICH *et al.*, 2013). Este loop parece fazer parte de uma das

interfaces de montagem, a interface 3. Em Dnm1 de leveduras, uma mutação neste motivo impede seu direcionamento mitocondrial (FORD *et al.*, 2011).

Nós usamos esta mesma estratégia para obter mutantes que não são capazes de se oligomerizarem. Esta mutação foi denominada de MAGMH391-395AAAAA. Conforme comprovado por espalhamento de luz em ângulo reto, a proteína purificada com esta mutação foi identificada apenas como dímeros. Vale a pena ressaltar que em solução, a dinamina é encontrada em equilíbrio de dímeros e tetrâmeros (FRÖHLICH *et al.*, 2013).

A outra mutação que geramos na TcDLP foi a deleção de um loop localizado na região do domínio PH das dinaminas clássicas. Neste trabalho este loop foi identificado como Loop 4, assim como acontece para a MxA (GAO *et al.*, 2010). No entanto, em outras DLPs esta região recebe outras identificações, como mostrado na FIGURA 8 (Introdução). Recentemente, esta região da proteína DNM1L foi identificada como *B-insert* (FRÖHLICH *et al.*, 2013). Este loop parece estar envolvido com a ligação da proteína à membrana. Segundo Fröhlich *et al.* (2013), a variante de DNM1L não contendo o *B-insert* (ΔB) não é capaz de tubular lipossomos, indicando que esse loop tem um papel essencial na montagem de DNM1L na superfície das membranas.

Portanto, a estratégia de efeito dominante negativo utilizando estas três mutações (K39A, MAGMH391-395AAAAA e $\Delta L4$) contempla as três principais características presente nessa superfamília de proteínas, que são: atividade GTPásica, capacidade de automontagem para formação de oligômeros e interação com membranas lipídicas.

Geralmente, a captação de macromoléculas pelo processo de endocitose acontece de uma forma muito rápida, dificultando a caracterização do processo nos tripanosomatídeos. Estudos anteriores sugerem que formas epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de ingerir proteínas através de endocitose mediada por receptor (DE FIGUEIREDO; SOARES, 2000; PORTO-CARREIRO *et al.*, 2000; SOARES; DE SOUZA, 1991), mas as moléculas envolvidas nas etapas iniciais do processo de endocitose ainda são pouco conhecidas.

Utilizando a estratégia de dominância negativa e ensaio de endocitose por captação de transferrina foi possível identificar a presença da TcDLP nas regiões de endocitose no *T. cruzi*: a bolsa flagelar e o complexo citóstoma/citofaringe. Nestes locais vimos uma colocalização da TcDLP e transferrina, uma molécula sabidamente

endocitada pelo organismo em estudo. Este dado fornece um forte indício de que TcDLP participa do processo endocítico nestes locais.

Com a expressão de TcDLP mutadas, estas interferem em todo o processo de endocitose, impedindo ou dificultado que este evento celular aconteça, facilitando, então, a identificação de etapas intermediárias. As alterações causadas por esta interferência são chamadas de efeito dominante negativo.

É importante discutir aqui que foi com a utilização da população de *T. cruzi* expressando TcDLP-Flag que melhor se observou a colocalização da proteína de interesse com a transferrina nos portais endocíticos e onde ocorreu uma grande interferência na captação desta pelo parasita. Apesar da TcDLP-Flag não conter mutação, foi verificado por *western blot* que ela estava superexpressa no parasita transfectado. É plausível supor que a superexpressão da TcDLP-Flag tenha sequestrado as proteínas acessórias parceiras, alterando a estequiometria dos complexos necessários para a continuação do processo. No entanto, não foram observadas outras alterações nesses parasitas, como verificado pela curva de crescimento e a análise do ciclo celular por citometria de fluxo.

De modo contrário, as TcDLPs mutadas mostraram, como um dos efeitos de dominância negativa, alterações no ciclo celular, com parasitas mostrando diversos fenótipos quanto ao número de núcleos (N) e cinetoplastos (K), tais como 1N, 1K, 2N1K, 3N3K.

O ciclo celular de eucariotos é caracterizado pela progressão de eventos associados que permitem a igual separação do material genético entre as células filhas (MURRAY, 2004). Portanto, a verificação de parasitas mutantes com tais fenótipos, obtidos através de efeito dominante negativo de uma proteína essencial, é uma informação bastante interessante.

Os tripanosomas são protistas flagelados que apresentam uma característica peculiar de possuir organelas únicas, tais como complexo de Golgi, uma mitocôndria localizado ao longo do parasita e que abriga um único cinetoplasto, e possui também um único flagelo que emerge de uma área de invaginação de membrana que reveste o corpo celular e forma a bolsa flagelar (DE SOUZA, 2009). Portanto, a divisão destas organelas deve estar orquestrada com a mitose e citocinese.

O ciclo celular do *Trypanosoma cruzi* segue os seguintes eventos: síntese de DNA no núcleo e no cinetoplasto, crescimento de um novo flagelo, segregação do cinetoplasto, mitose nuclear, formação de uma nova bolsa flagelar, e finalmente, citocinese (ELIAS *et al.*, 2011). A figura a seguir esquematiza este processo.

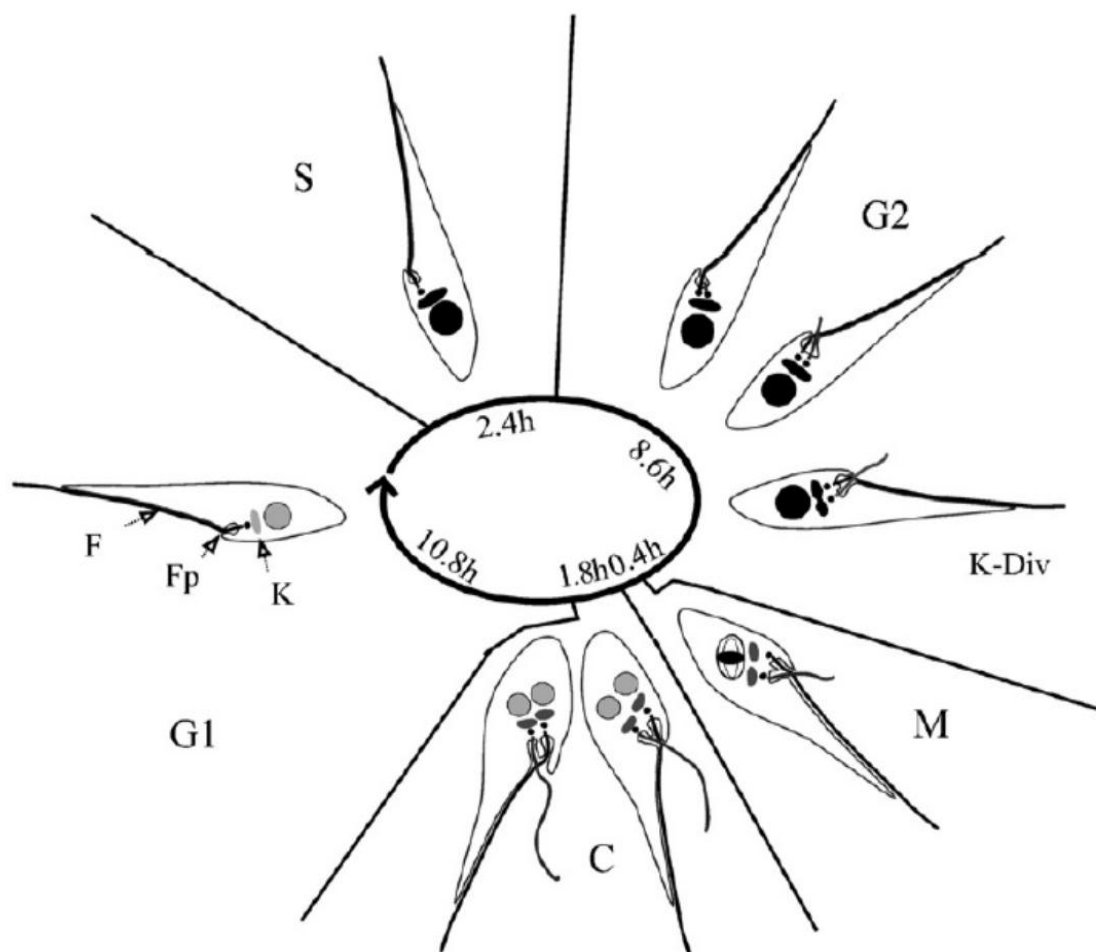


FIGURA 93 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DURANTE O CICLO CELULAR DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DO *Trypanosoma cruzi*. As fases do ciclo celular nuclear estão indicadas como G1, S, G2, M (mitose) e C (citocinese). O sombreamento do núcleo é proporcional ao conteúdo de DNA. O novo flagelo é mostrado em cinza e o antigo, em preto. O novo flagelo emerge da bolsa flagelar quando as células estão na fase G2 e é nesta fase que o cinetoplasto se segrega. Em seguida ocorre a mitose, depois a bolsa flagelar se separa e por fim ocorre a citocinese, dando origem a duas células filhas idênticas. N = núcleo, K = cinetoplasto, F = flagelo, Fp = bolsa flagelar. A duração de cada fase do ciclo celular está representada dentro do círculo. Estes tempos variam de acordo com a composição do meio e da cepa de *T. cruzi*.

FONTE: Elias *et al.* (2011).

Analisando a figura acima e comparando-a com as alterações, mostradas por imunofluorescência, em populações de *T. cruzi* com efeito dominante negativo para TcDLP, concluímos que o ciclo celular dos parasitas expressando TcDLP mutadas está visivelmente alterado. Pelas alterações observadas, sugerimos que TcDLP atua tanto na mitose, quanto na citocinese. A participação da dinamina na mitose é bastante controversa. No entanto, artigos recentemente publicados (CHIRCOP *et al.*, 2011; ISHIDA *et al.*, 2011; SMITH; CHIRCOP, 2013) citam sua participação na citocinese, principalmente no estágio final de clivagem.

Segundo Smith e Chircop (2013), a depleção de proteínas que participam da endocitose mediada por clatrina (CME), incluindo a dinamina 2, causa um atraso na fase de clivagem da citocinese e induz multinucleação. De uma maneira geral, eles citam oito proteínas que participam da CME e estão envolvidas na eficiente progressão da mitose, bem como a finalização deste processo. Em parte, esta participação é devido às atividades endocíticas dessas proteínas. No entanto, a principal conclusão é que seis destas proteínas possuem uma função secundária duante a mitose e que não é dependente de sua atividade de endocitose, sendo que a Dinamina 2 não está compreendida neste último grupo, como mostra a figura abaixo.

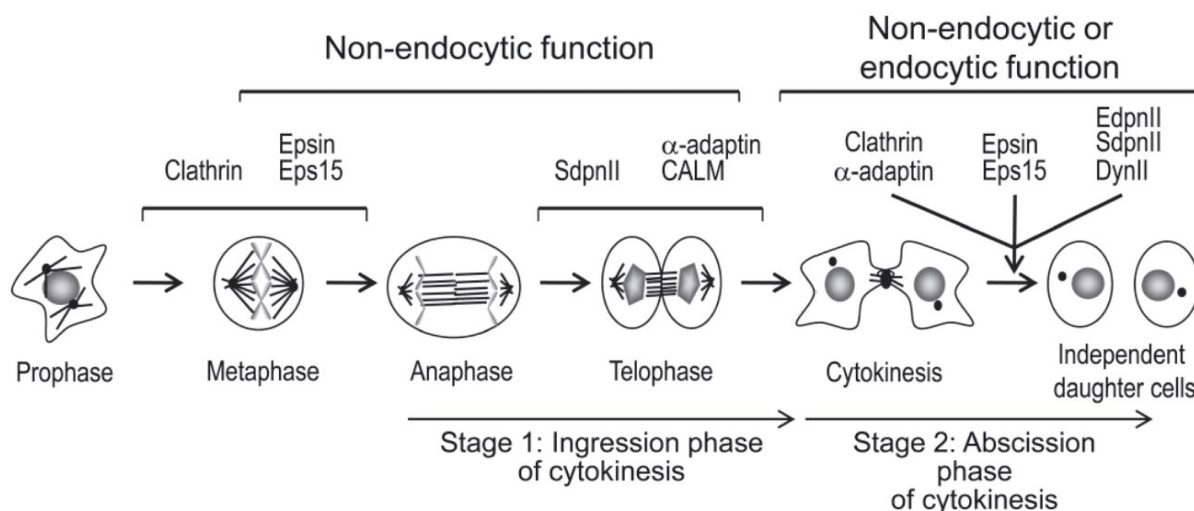


FIGURA 94 – MODELO PROPOSTO DE PONTOS DE AÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA ENDOCITOSE MEDIADA POR CLATRINA DURANTE A MITOSE. Esta figura mostra oito proteínas envolvidas na endocitose mediada por clatrina e que participam em distintos estágios da mitose. FONTE: Smith e Chircop (2013).

É bastante sugestivo de que TcDLP esteja realmente participando da citocinese em *T. cruzi*, como descrito para outras dinaminas de diversos organismos, tais como a Dyn-1 em *C. elegans* (THOMPSON *et al.*, 2002), DlpA, DlpB e DlpC em *D. discoideum* (MIYAGISHIMA, *et al.*, 2008), ainda mais porque somente esta dinamina está presente no parasita.

Fato curioso foi identificarmos DNA em regiões que não compreendem o núcleo e nem o cinetoplasto nos parasitas contendo TcDLPs mutadas, como mostrado nas figuras 83-86, na maioria das vezes em locais bem próximos à membrana celular.

Segundo Ishida *et al* (2011), Dinamina 2, em células mitóticas, está associada com microtúbulos e esta interação é dependente do domínio PRD. Rastreamento da localização da dinamina 2 por imunofluorescência e microscopia eletrônica durante todos os estágios da mitose, demonstrou que a dinamina se acumula no fuso mitótico durante a mitose. Esta localização depende da formação de microtúbulos, já que a perturbação na organização dos microtúbulos altera a localização da dinamina. Também já foi descrito que o domínio central da dinamina interage com γ -tubulina, um componente do centrosomo o qual desempenha um papel chave no início da mitose (THOMPSON *et al.*, 2004).

Observando as imagens publicadas por Elias *et al.* (2011), onde mostra formas epimastigotas de *T. cruzi* em mitose utilizando anticorpo anti-tubulina, pode-se perceber que a tubulina participa na formação do fuso mitótico e também percebe-se sua localização na rede subpelicular de microtúbulos que está associada com a membrana plasmática e envolve todo o parasita.

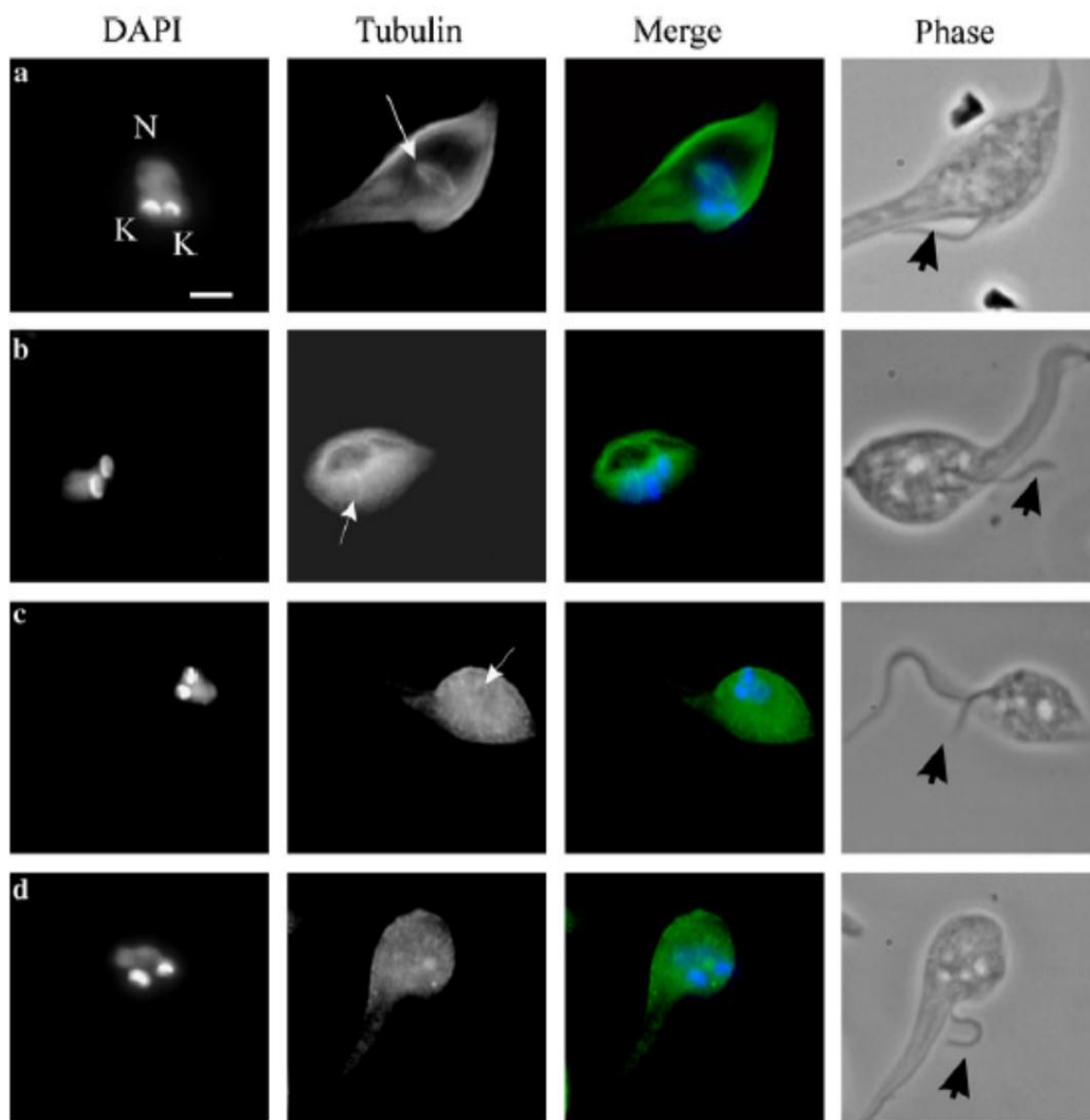


FIGURA 95 – LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA TUBULINA NO FUSO MITÓTICO E NA REDE SUBPELICULAR DE MICROTÚBULOS EM *Trypanosoma cruzi*. A sobreposição (merge) mostra a tubulina em verde e o DAPI (marcação de ácidos nucléicos) em azul. Estão sendo indicados o fuso mitótico (setas brancas) e o flagelo (setas pretas). N = núcleo, K = cinetoplasto. Barra = 2 μ M.

FONTE: Elias *et al.* (2011).

Estas observações, juntamente com os nossos resultados com as TcDLPs mutantes, levam à suposição que TcDLP possa interagir com a tubulina que participa na formação do fuso mitótico dos parasitas em mitose. Por essa hipótese, a presença das TcDLPs mutantes, leva à redução ou perda da interação com os microtúbulos, fazendo com que a segregação do material genético não ocorra corretamente. Como

consequência, parte do DNA é segregado do núcleo, arrastado juntamente com os microtúbulos, para regiões citoplasmáticas. Também foi possível observar por microscopia eletrônica, o efeito dominante negativo de DD-TcDLPK39A no complexo de Golgi, onde foi possível observar túbulos alargados. Este resultado também foi visto na primeira vez que foi reportada esta mutação em células HeLa (DAMKE *et al.*, 1994).

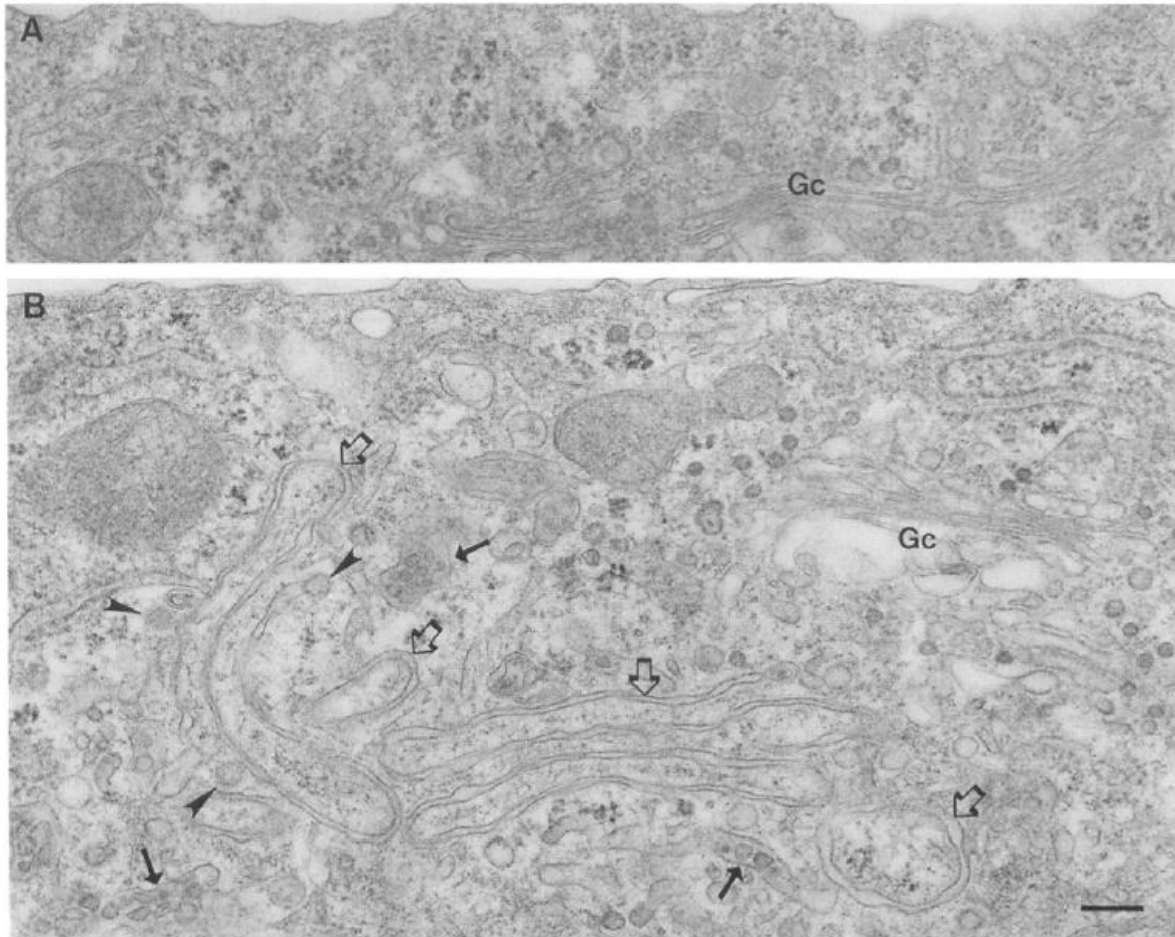


FIGURA 96 – ALTERAÇÃO NO COMPLEXO DE GOLGI DE CÉLULAS HeLa TRANSFECTADAS COM A DINAMINA MUTANTE K44A. A) Células HeLa do tipo selvagem. B) Células HeLa mutantes. As setas abertas indicam as estruturas tubulares alongadas, muitas destas estruturas possuem vesículas revestidas em formação (cabeça de seta). As setas fechadas indicam estruturas que se assemelham a corpos multivesicular.

FONTE: Labrousse *et al.* (1989).

Nossos resultados mostrando alterações no complexo de Golgi, juntamente com os resultados de Sant'Anna e colaboradores (2004), mostrando que vesículas revestidas por clatrina são liberadas do complexo de Golgi sugerem fortemente que TcDLP participa da liberação de vesículas no complexo de Golgi.

Observamos também, pelo mesmo ensaio, que a mitocôndria está aumentada, mostrando que TcDLP também é importante na divisão mitocondrial.

Vários estudos sugerem que as proteínas semelhantes à dinamina: Mgm1 (JONES; FANGMAN, 1992) e Dnm1 (GAMMIE *et al.*, 1995) em fungos, e Drp1 em *C. elegans* estão envolvidas com a morfologia mitocondrial. Mgm1 se localiza na membrana externa da mitocôndria e uma mutação no domínio GTPase leva a um efeito dominante negativo de agregação da mitocôndria (SHEPARD; YAFFE, 1999). Ambos, Dnm1 e Drp1, se localizam no sítio de constrição mitocondrial ou no sítio de fissão das células. Células transfectadas com Drp1 ou Dnm1 mutantes exibem um defeito na fragmentação da mitocôndria (OTSUGA *et al.*, 1998; SMIRNOVA *et al.*, 1998; BLEAZARD *et al.*, 1999; LABROUSSE *et al.*, 1999; SESAKI; JENSEN, 1999). Além disso, super-expressão de Drp1 na sua forma nativa em *C. elegans* também causa excessiva fragmentação mitocondrial (LABROUSSE *et al.*, 1999).

Já foi demonstrado também que em *T. brucei*, a TbDLP participa da fissão mitocondrial, além de participar da endocitose e citocinese (CHANEZ *et al.*, 2006). Por ensaio de imunofluorescência dos parasitas dominante negativo, identificamos um padrão de localização de TcDLP em linhas pontuais que provavelmente represente sua localização na mitocôndria, como foi mostrado na figura 90. Do mesmo modo, a proteína Drp-1 em *C. elegans*, essencial para a viabilidade desse nematódeo, se localiza de modo pontual, coincidindo com as regiões de constrição da mitocôndria (FIGURA 97). É possível, portanto, que o padrão pontual da dinamina em *T. cruzi* represente os pontos de constrição de sua mitocôndria.

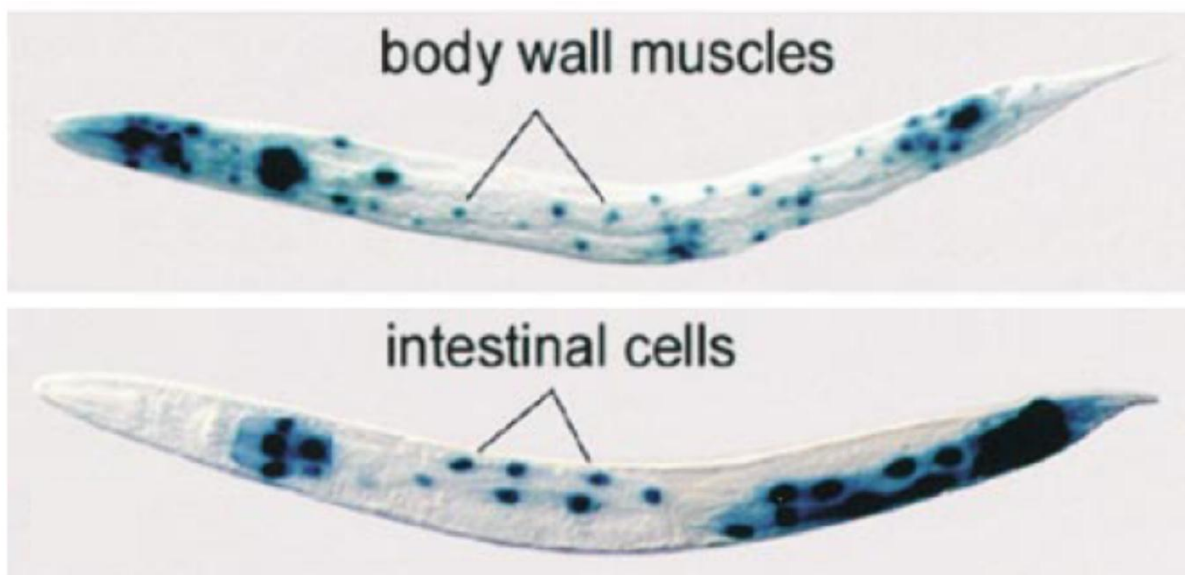


FIGURA 97 – PADRÃO DE EXPRESSÃO DE Drp-1 EM *C. elegans*. As setas indicam o padrão de expressão de Drp-1 na mitocôndria em pontos em linha.

FONTE: Labrousse *et al.* (1999)

Nossos resultados mostram que TcDLP participa de importantes eventos celulares no parasita *T. cruzi* tais como, divisão mitocondrial, endocitose, tráfego de vesículas e participação no ciclo celular. O nocaute gênico mostrou que TcDLP é essencial para a viabilidade desse parasita, causador da doença de Chagas, o que abre perspectivas para o uso dessa proteína como alvo de inibidores que possam ser usados na quimioterapia dessa doença. Desse modo, a obtenção da estrutura tri-dimensional da TcDLP e a continuação da triagem de compostos iniciada durante o período de bolsa-sanduíche na Alemanha serão de extrema importância para a continuação do projeto.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, podemos concluir:

1. TcDLP é uma dinamina não clássica, contendo os domínios GTPase, domínio central e o domínio efetor da GTPase (GED);
2. TcDLP possui os resíduos de aminoácidos importantes para a atividade GTPásica conservados;
3. TcDLP é expressa nas principais formas do ciclo de vida do *T. cruzi*;
4. TcDLP se localiza majoritariamente na bolsa flagelar e no complexo citóstoma/citofaringe;
5. TcDLP compartilha características bioquímicas e biofísicas de outros membros da superfamília das dinaminas, tais como:
 - a. Possuir atividade GTPásica;
 - b. Cosedimentar com lipossomos;
 - c. Formar estruturas semelhantes a anéis *in vitro*.
6. O gene codificador da proteína TcDLP provavelmente é um gene essencial; visto que não foi possível obter o mutante *Tcdlp*-nulo.
7. Assim como outras DLPs, TcDLP pode estar participando de diversos eventos celulares no parasita, tais como:
 - a. Processo de endocitose na bolsa flagelar e no complexo citóstoma/citofaringe;
 - b. Tráfego de vesículas, pela rede de túbulos e vesículas, que destinam moléculas endocitadas aos reservossomos;
 - c. Liberação de vesículas do complexo de Golgi;
 - d. Divisão mitocondrial;
 - e. Participação no ciclo celular do *T. cruzi*, possivelmente através dos eventos de mitose e citocinese.

REFERÊNCIAS

ALLEN, C.L; GOULDING, D; FIELD, M.C. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, 22: 4991-5002, 2003.

ATLAS DIDÁTICO. **O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***. Disponível em: <<http://labspace.open.ac.uk/mod/resource/view.php?id=459540>>. Acesso em: 10/05/2013.

BASHKIROV, P.V; AKIMOV, S.A; EVSEEV, A.I; SCHMID, S.L; ZIMMERBERG, J; FROLOV, V.A. GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. **Cell**, 135(7): 1276-1286, 2008.

BATISTA, M; MARCHINI, F.K; CELEDON, P.A; FRAGOSO, S.P; PROBST, C.M; PRETI, H; OZAKI, L.S; BUCK, G.A; GOLDENBERG, S; KRIEGER, M.A. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol.**, 10: 259, 2010.

BIAN, X; KLEMM, R.W; LIU, T.Y; ZHANG, M; SUN, S; SUI, X; LIU, X; RAPOPORT, T.A; HU, J. Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 108(10): 3976-3981, 2011.

BLEAZARD, W; MCCAFFERY, J.M; KING, E.J; BALE, S; MOZDY, A; TIEU, Q; NUNNARI, J; SHAW, J.M. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. **Nature Cell Biol.**, 1: 298-304, 1999.

BODMER, D; ASCANO, M; KURUVILLA, R; Isoform-specific dephosphorylation of dynamin1 by calcineurin couples neurotrophin receptor endocytosis to axonal growth. **Neuron**, 70: 1085–1099, 2011.

BONALDO, M.C; SOUTO-PADRÓN, T; DE SOUZA, W; GOLDENBERG, S. Cell - substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol.**, 106: 349–1358, 1988.

BOUCROT, E; PICK, A; ÇAMDERE, G; LISKA, N; EVERGREN, E; McMAHON, H.T; KOZLOV, M.M. Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. **Cell**, 149(1): 124-136, 2012.

BRAMKAMP, M. Structure and function of bacterial dynamin-like proteins. **Biol Chem.**, 393(11): 1203-1214, 2012.

BREINICH, M.S; FERGUSON, D.J; FOTH, B.J; VAN DOOREN, G.G; LEBRUN, M; QUON, D.V; STRIEPEN, B; BRADLEY, P.J; FRISCHKNECHT, F; CARRUTHERS, V.B; MEISSNER, M.A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. **Curr Biol.**, 19(4): 277-286, 2009.

BRICKMAN, M.J; COOK, J.M; BALBER, A. E. Low temperature reversibly inhibits transport from tubular endosomes to a perinuclear, acidic compartment. **J. Cell Sci.**, 108: 3611-3621, 1995.

BYRNES, L.J; SONDERMANN, H. Structural basis for the nucleotide-dependent dimerization of the large G protein atlastin-1/SPG3A. **Proc Natl Acad Sci USA**, 108: 2216-2221, 2011.

CAO, H; GARCIA, F; McNIVEN, M.A. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. **Mol Biol Cell.**, 9:2595–2609, 1998.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1: 159-218, 1909.

CHANEZ, A.L; HEHL, A.B; ENGSTLER, M; SCHNEIDER, A. Ablation of the single dynamin of *T. brucei* blocks mitochondrial fission and endocytosis and leads to a precise cytokinesis arrest. **J Cell Sci.**, 119: 2968-2974, 2006.

CHAPPIE, J.S; ACHARYA, S; LEONARD, M; SCHMID, S.L; DYDA, F. G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. **Nature**, 465: 435-440, 2010.

CHAPPIE, J.S; MEARS, J.A; FANG, S; LEONARD, M; SCHMID, S.L; MILLIGAN, R.A; HINSHAW, J.E; DYDA, F. A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. **Cell**, 147(1): 209-222, 2011.

CHEN, Y.J; ZHANG, P; EGELMAN, E.H; HINSHAW, J.E. The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 11: 574-575, 2004.

CLARK, S.G; SHURLAND, D.L; MEYEROWITZ, E.M; BARGMANN, C.I; VAN DER BLIEK, A.M. A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature inducible locomotion defect in *C. elegans*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 10438–10443, 1997.

CONTRERAS, V.T; ARAUJO-JORGE, T.C; BONALDO, M.C; THOMAZ, N; BARBOSA, H.S; MEIRELLES, M.N; GOLDENBERG, S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 83: 123-133, 1988.

CONTRERAS, V.T; SALLES, J.M; THOMAS, N; MOREL, C.M; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol.**, 16: 315-327, 1985.

COOK, T.A; URRUTIA, R; McNIVEN, M.A. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91: 644–648, 1994.

COPPENS, I; OPPERDOES, F.R; COURTOY, P.J; BAUDHUIN, P. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. **J Protozool.**, 34(4):465-73, 1987.

CORRÊA, J.R; ATELLA, G.C; BATISTA, M.M; SOARES, M.J. Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis. **Exp Parasitol.**, 119: 58-66, 2008.

CORRÊA, J.R; ATELLA, G.C; MENNA-BARRETO, R.S; SOARES, M.J. Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites. **J Euk Microbiol.**, 54: 297-302, 2007.

DAMKE, H; BABA, T; VAN DER BLIEK, A.M; SCHMID, S.L. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperaturesensitive mutant of dynamin. **J. Cell Biol.**, 131: 69–80, 1995.

DAUMKE, O; LUNDMARK, R; VALLIS, Y; MARTENS, S; BUTLER, P.J; McMAHON, H.T. Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. **Nature**, 449(7164): 923-927, 2007.

DE FIGUEIREDO, R.C; SOARES, M.J. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res.**, 86: 413-418, 2000.

DE SOUZA, F.S; RAMPAZZO, R. DE C; MANHAES, L; SOARES, M.J; CAVALCANTI, D.P; KRIEGER, M.A; GOLDENBERG, S; FRAGOSO, S.P. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 172(2): 90-98, 2010.

DE SOUZA W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des.**, 8: 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cyt.**, 86:197-283, 1984.

DE SOUZA, W. **Métodos morfológicos.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=12>>. Acesso em: 10/05/2013.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104(Suppl. I): 89-100, 2009.

DE SOUZA, W; DE CARVALHO, T.U; BENCHIMOL, M; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. **Exp Parasitol.**, 45: 101–115, 1978.

DE SOUZA, W; SANT'ANNA, C; CUNHA-E-SILVA, N.L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Prog Histochem Cytochem.**, 44(2): 67-124, 2009.

DELETTRE, C; LENAERS, G; GRIFFOIN, J.M; GIGAREL, N; LORENZO, C; BELENGUER, P; PELLOQUIN, L; GROSGEORGE, J; TURC-CAREL, C; PERRET, E; ASTARIE-DEQUEKER, C; LASQUELLEC, L; ARNAUD, B; DUCOMMUN, B; KAPLAN, J; HAMEL, C.P. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. **Nat Genet.**, 26(2): 207-210, 2000.

DENNY, P.W; MORGAN, G.W; FIELD, M.C; SMITH, D.F. *Leishmania major*. Clathrin and adaptin complexes of an intra-cellular parasite. **Exp Parasitol.**, 109: 33–37, 2005.

DETMER, S.A; CHAN, D.C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. **Nature reviews. Molecular cell biology**, 8: 870-879, 2007.

DOWNING, A.K; DRISCOLL, P.C; GOUT, I; SALIM, K; ZVELEBIL, M.J; WATERFIELD, M.D. Three-dimensional solution structure of the pleckstrin homology domain from dynamin. **Curr Biol.**, 4(10): 884-891, 1994.

ELIAS, M.C; DA CUNHA, J.P; DE FARIA, F.P; MORTARA, R.A; FREYMÜLLER, E; SCHENKMAN, S. Morphological events during the Trypanosoma cruzi cell cycle. **Protist.** 158(2): 147-157, 2007.

FAELBER, K; HELD, M; GAO, S; POSOR, Y; HAUCKE, V; NOÉ, F; DAUMKE, O. Structure insights into dynamin-mediated membrane fission. **Structure.** 20(10): 1621-1628, 2012.

FAELBER, K; POSOR, Y; GAO, S; HELD, M; ROSKE, Y; SCHULZE, D; HAUCKE, V; NOÉ, F; DAUMKE, O. Crystal structure of nucleotide-free dynamin. **Nature**, 477(7366): 556-560, 2011.

FERGUSON, K.M; LEMMON, M.A; SCHLESSINGER, J; SIGLER, P.B. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. **Cell**, 79: 199-209, 1994.

FERGUSON, S.M; BRASNJO, G; HAYASHI, M; WÖLFEL, M; COLLESI, C; GIOVEDI, S; RAIMONDI, A; GONG, L.W; ARIEL, P; PARADISE, S; O'TOOLE, E; FLAVELL, R; CREMONA, O; MIESENBOCK, G; RYAN, T.A; DE CAMILLI, P. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. **Science.**, 316(5824):570-574, 2007.

FERGUSON, S.M; DE CAMILLI, P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 13 (2): 75-88, 2012.

FIELD, H; FARJAH, M; PAL, A; GULL, K; FIELD, M.C. Complexity of trypanosomatid

endocytosis pathways revealed by Rab4 and Rab5 isoforms in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem.**, 273: 32102-31110, 1998.

FIELD, M.C; CARRINGTON, M. Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. **Traffic**, 5: 905-913, 2004.

FORD, M.G.J; JENNI, S; NUNNARI, J. The crystal structure of dynamin. **Nature**, 477(7366):561-566, 2011.

FRES, J.M; MÜLLER, S; PRAEFCKE, G.J. Purification of the CaaX-modified, dynamin-related large GTPase hGBP1 by coexpression with farnesyltransferase. **J Lipid Res.**, 51(8): 2454-2459, 2010.

FRÖHLICH, C; GRABIGER, S; SCHWEFEL, D; FAELBER, K; ROSENBAUM, E; MEARS, J; ROCKS, O; DAUMKE, O. Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. **EMBO J.**, 32(9):1280-1292, 2013.

GAMMIE, A.E; KURIHARA, L.J; VALLEE, R.B; ROSE, M.D. DNM1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. **J Cell Biol.**, 130: 553-566, 1995.

GAO, S; VON DER MALSBURG, A; DICK, A; FAELBER, K; SCHRODER, G.F; HALLER, O; KOCHS, G; DAUMKE, O. Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. **Immunity**, 35: 514-525, 2011.

GAO, S; VON DER MALSBURG, A; PAESCHKE, S; BEHLKE, J; HALLER, O; KOCHS, G; DAUMKE, O. Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. **Nature**, 465(7297): 502-506, 2010.

GASPER, R; MEYER, S; GOTTHARDT, K; SIRAJUDDIN, M; WITTINGHOFER, A. It takes two to tango: regulation of G proteins by dimerization. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10: 423–429, 2009.

GRAY, N.W; FOURGEAUD, L; HUANG, B; CHEN, J; CAO, H; OSWALD, B.J; HÉMAR, A; McNIVEN, M.A. Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. **Current biology**, 13: 510–155, 2003.

GRUNFELDER, C.G; ENGSTLER, M; WEISE, F; SCHWARZ, H; STIERHOF, Y.D; MORGAN, G; FIELD, M.C; OVERATH, P. Endocytosis of a glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. **Mol Biol Cell.**, 14: 2029-2040, 2003.

GU, X; VERMA, D.P. Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. **The EMBO journal**, 15: 695-704, 1996.

HALLER, O; GAO, S; VON DER MALSBURG, A; DAUMKE, O; KOCHS, G. Dynamin-like MxA GTPase: structural insights into oligomerization and implications for antiviral activity.

The Journal of biological chemistry, 285: 28419-28424, 2010.

HANSSON, M.D; RZEZNICKA, K; ROSENBACK, M; HANSSON, M; SIRIJOVSKI, N. PCR-mediated deletion of plasmid DNA. **Anal Biochem.**, 375: 373–375, 2008.

HINSHAW, J.E; SCHMID, S.L. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. **Nature**, 374(6518): 190-192, 1995.

HOPPINS, S; LACKNER, L; NUNNARI, J. The machines that divide and fuse mitochondria. **Annual review of biochemistry**, 76: 751-780, 2007.

HU, J; SHIBATA, Y; ZHU, P.P; VOSS, C; RISMANCHI, N; PRINZ, W.A; RAPOPORT, T.A; BLACKSTONE, C. A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. **Cell**, 138: 549-561, 2009.

INGERMAN, E; MEEUSEN, S; DEVAY, R; NUNNARI, J. In vitro assays for mitochondrial fusion and division. **Methods Cell Biol.**, 80: 707-720, 2007.

JONES, B.A; FANGMAN, W.L. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. **Genes Dev.**, 6: 380-389, 1992.

KANG, B.H; BUSSE, J.S; BEDNAREK, S.Y. Members of the Arabidopsis dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. **Plant Cell**, 15: 899–913, 2003.

KENNISTON, J.A; LEMMON, M.A. Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. **EMBO J.**, 29(18): 3054-3067, 2010.

KLEIN, D.E; LEE, A; FRANK, D.W; MARKS, M.S; LEMMON, M.A. The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. **J Biol Chem.**, 273(42): 27725-27733, 1998.

KLOCKOW, B; TICHELAAR, W; MADDEN, D. R; NIEMANN, H.H; AKIBA, T; HIROSE, K; MANSTEIN, D.J. The dynamin A ring complex: molecular organization and nucleotide-dependent conformational changes. **EMBO J.**, 21(3):240-250, 2002.

KROPF, S.P. **História da doença de Chagas: ciência, saúde e sociedade**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=171>>. Acesso em: 10/05/2013.

LABROUSSE, A.M; ZAPPATERRA, M.D; RUBE, D.A; VAN DER BLIEK, A.M. *C. elegans* dynamin-related protein *drp-1* controls severing of the mitochondrial outer membrane. **Mol. Cell.**, 4: 815-826, 1999.

LANDFEAR, S.M; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Mol Biochem Parasitol.**, 115(1):1-17, 2001.

LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annu. Rev. Biochem.**, 58: 913-949, 1989.

LEE, A; FRANK, D.W; MARKS, M.S; LEMMON, M.A. Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. **Current biology**, 9: 261-264, 1999.

LEIPE, D.D; WOLF, Y.I; KOONIN, E.V; ARAVIND, L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. **J. Mol. Biol.**, 317:41-72, 2002.

LIU, Y.W; NEUMANN, S; RAMACHANDRAN, R; FERGUSON, S.M; PUCADYIL, T.J; SCHMID, S.L. Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 108:E234-242, 2011.

LOW, H.H; LÖWE, J. A bacterial dynamin-like protein. **Nature**, 444: 766-769, 2006.

LOW, H.H; LÖWE, J. Dynamin architecture—from monomer to polymer. **Curr Opin Struct Biol.**, 20(6): 791-798, 2010.

LOW, H.H; SACHSE, C; AMOS, L.A; LÖWE, J. Structure of a bacterial dynamin-like protein lipid tube provides a mechanism for assembly and membrane curving. **Cell**, 139: 134-152, 2009.

MACRAE, J.I; OBADO, S.O; TURNOCK, D.C; ROPER, J.R; KIERANS, M; KELLY, J. M; FERGUSON, M.A. The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 147: 126-136, 2006.

MASUD RANA, A.Y; TSUJIOKA, M; MIYAGISHIMA, S; UEDA, M; YUMURA, S. Dynamin contributes to cytokinesis by stabilizing actin filaments in the contractile ring. **Genes Cells**, 2013.

MAYOR, S; PAGANO, R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 8: 603-609, 2007.

MEARS, J.A; RAY, P; HINSHAW, J.E. A corkscrew model for dynamin constriction. **Structure**, 15: 1190-1202, 2007.

MEDINA-ACOSTA, E; CROSS, G.A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 59: 327-329, 1993.

MERCER, J; SCHELHAAS, M; HELENIUS, A. Virus entry by endocytosis. **Annual review of biochemistry**, 79: 803–833, 2010.

METTLEN, M; PUCADYIL, T; RAMACHANDRAN, R; SCHMID, S.L. Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. **Biochem Soc Trans.**, 37(5): 1022-1026, 2009.

MILDER R, DEANE MP. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini*. **J Protozool.**, 16: 730-737, 1969.

MIYAGISHIMA, S.Y; NISHIDA, K; MORI, T; MATSUZAKI, M; HIGASHIYAMA, T; KUROIWA, H; KUROIWA, T. A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. **The Plant cell**, 15: 655-665, 2003.

MORGAN, G.W; GOULDING, D; FIELD, M.C. The single dynamin-like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. **J Biol Chem.**, 279:10692-10701, 2004.

MORGAN, G. W.; HALL, B. S.; DENNY, P. W.; CARRINGTON, M., FIELD, M. C. The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. **Trends Parasitol.**, 18: 491–496, 2002.

MOSS, T.J; ANDREAZZA, C; VERMA, A; DAGA, A; MCNEW, J.A. Membrane fusion by the GTPase atlastin requires a conserved C-terminal cytoplasmic tail and dimerization through the middle domain. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 108(27): 11133-11138, 2011.

NAKATA, T; IWAMOTO, A; NODA, Y; TAKEMURA, R; YOSHIKURA, H; HIROKAWA, N. Predominant and developmentally regulated expression of dynamin in neurons." **Neuron**, 7(3): 461-469, 1991.

NAKATA, T.R; TAKEMURA, N; HIROKAWA. J. A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. **Cell Sci.**, 105: 1-5, 1993.

OKAMOTO, K; SHAW, J.M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. **Annual review of genetics**, 39: 503-536, 2005.

ORSO, G; PENDIN, D; LIU, S; TOSETTO, J; MOSS, T.J; FAUST, J.E; MICARONI, M; EGOROVA, A; MARTINUZZI, A; MCNEW, J.A; DAGA, A. Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. **Nature**, 460: 978-983, 2009.

OTSUGA, D; KEEGAN, B.R; BRISCH, E; THATCHER, J.W; HERMAN, G.J; BLEAZARD, W; SHAW, J.M. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. **J Cell Biol.**, 19: 333-349, 1998.

OVERATH, P; STIERHOF, Y.D; WIESE, M. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - tumultuous traffic in a pocket. **Trends Cell Biol.**, 7: 27-33, 1997.

PIZZATO, M; HELANDER, A; POPOVA, E; CALISTRI, A; ZAMBORLINI, A; PALÙ, G; GÖTTLINGER, H.G. Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. **Proc Natl Acad Sci USA**, 104: 6812–6817, 2007.

PORTO-CARREIRO, I; ATTIAS, M; MIRANDA, K; DE SOUZA, W; CUNHA-E-SILVA, N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **Eur J Cell Biol.**, 79: 858-869, 2000.

PRAEFCKE, G.J; MCMAHON, H.T. The Dynamin Superfamily: Universal membrane tubulation and fission molecules? **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 5: 133-147, 2004.

PRAKASH, B; PRAEFCKE, G.J; RENAULT, L; WITTINGHOFFER, A; HERRMANN, C. Structure of humans guanylate binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. **Nature**, 403: 567-571, 2000.

RAIMONDI, A; FERGUSON, S.M; LOU; ARMBRUSTER, ; PARADISE,S; , GIOVEDI S; MESSA, M; KONO, N; TAKASAKI, J; CAPPELLO, V; O'TOOLE, E; RYAN, T.A; DE CAMILLI, P. Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. **Neuron**. 70: 1100–1114, 2011.

RAMACHANDRAN, R. Vesicle scission: dynamin. **Semin Cell Dev Biol.**, 22(1):10-17, 2011.

RAMACHANDRAN, R; PUCADYIL, T.J; LIU, Y.W; ACHARYA, S; LEONARD, M; LUKIYANCHUK, V; SCHMID, S.L. Membrane insertion of the pleckstrin homology domain variable loop 1 is critical for dynamin-catalyzed vesicle scission. **Mol Biol Cell.**, 20(22): 4630-4639, 2009.

ROUX, A; KOSTER, G; LENZ, M; SORRE, B; MANNEVILLE, J.B; NASSOY, P; BASSEREAU, P. Membrane curvature controls dynamin polymerization. **Proc Natl Acad Sci USA**. 107(9): 4141-4146, 2010.

ROUX, A; UYHAZI, K; FROST, A; DE CAMILLI, P. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. **Nature**, 441: 528–531, 2006.

SAMBROOK, J; FRITSHC, E.F; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, N.Y. USA, 1989.

SANT'ANNA, C; DE SOUZA, W; CUNHA-E-SILVA, N. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. **Microsc Microanal.**, 10: 637-646, 2004.

SCHMID, S.L; FROLOV, V.A. Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, 27: 79-105, 2011.

SCITA, G; DI FIORE, P.P. The endocytic matrix. **Nature**, 463:464–473, 2010.

SESAKI, H; JENSEN, R.E. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. **J Cell Biol.**, 147: 699-706, 1999.

SHEPARD, K.A; YAFFE, M.P. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. **J Cell Biol.**, 144: 711-720, 1999.

SHPETNER, H.S; VALLEE, R.B. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. **Cell**, 59: 421-432, 1989.

SHUPLIAKOV, O; LÖW, P; GRABS, D; GAD, H; CHEN, H; DAVID, C; TAKEI, K; DE CAMILLI, P; BRODIN, L. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. **Science**, 276: 259-263.

SKOP, A.R; LIU, H; YATES, J.I; MEYER, B.J.; HEALD, R. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. **Science**, 305: 61–66, 2004.

SMIRNOVA, E; GRIPARIC, L; SHURLAND, D.L; VAN DER BLIEK, A.M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. **Mol Biol Cell**, 12(8):2245-2256, 2001.

SMIRNOVA, E; SHURLAND, D.L; RYAZANTSEV, S.N; VAN DER BLIEK, A.M. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. **J Cell Biol.**, 143: 351-358, 1998.

SOARES, M.J. Endocytic portals in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Parasitol Res.**, 99: 321-322, 2006.

SOARES, M.J; DE SOUZA, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res.**, 77: 461-468, 1991.

SOARES, M.J; SOUTO-PADRÓN, T; DE SOUZA, W. Identification of a large reticuloendosomal compartment in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Sci.**, 102: 157–167, 1992.

SOULET, F; YARAR, D; LEONARD, M; SCHMID, S.L. SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. **Mol. Biol. Cell**, 16: 2058-2067, 2005.

STOWELL, M.H; MARKS, B; WIGGE, P; McMAHON, H. T. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. **Nat Cell Biol.**, 1: 27-32, 1999.

SWEITZER, S.M; HINSHAW, J.E. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. **Cell**,

93: 1021-1029, 1998.

THOMPSON, H.M; SKOP, A.R.; EUTENEUER, U; MEYER, B.J; MCNIVEN, M.A. The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. **Curr Biol.**, 12: 2111–2117, 2002.

TOWBIN, H; STAEBLIN, T; BORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. USA**, 76: 4350-4354, 1979.

WARNOCK, D.E; SCHMID, S.L. Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. **Bioessays**, 18 (11): 885-893.

WATERHAM, H.R; KOSTER, J; VAN ROERMUND, C.W; MOOYER, P.A; WANDERS, R.J; LEONARD, J.V. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. **N Engl J Med.**, 356(17): 1736-1741, 2007.

WEBSTER, P; RUSSEL, D.G. The flagellar pocket of trypanosomatids. **Parasitol Today**, 9: 201-205, 1993.

WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nature reviews. Molecular biology**, 11: 872-884, 2010.

WIENKE, D.C; KNETSCH, M.L; NEUHAUS, E.M; REEDY, M.C; MANSTEIN, D.J. Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. **Mol Biol Cell.**, 10: 225–243, 1999.

VALLIS, Y; WIGGE, P; MARKS, B; EVANS, P.R; McMAHON, H.T. Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. **Curr Biol.**, 9(5): 257-260, 1999.

VAN DER BLIEK, A. M. Functional diversity in the dynamin family. **Trends Cell Biol.**, 9: 96-102, 1999.

VATARUNAKAMURA, C; UEDA-NAKAMURA, T; DE SOUZA, W. Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. **FEMS Microbiol Lett.**, 242: 227-230, 2005.

VON DER MALSBERG, A; ABUTBUL-IONITA, I; HALLER, O; KOCHS, G; DANINO, D. Stalk domain of the dynamin-like MxA GTPase protein mediates membrane binding and liposome tubulation via the unstructured L4 loop. **J Biol Chem.**, 286(43): 37858-37865, 2011.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitol Int.**, 57: 105-109, 2008.

XUE, J; GRAHAM, M.E; NOVELLE, A.E; SUE, N; GRAY, N; McNIVEN, M.A; SMILLIE, K.J; COUSIN, M.A; ROBINSON, P.J. Calcineurin selectively docks with the dynamin Ixb splice variant to regulate activity-dependent bulk endocytosis. **The Journal of biological chemistry**. 286: 30295–30303, 2011.

ZHANG, P; HINSHAW, J.E. Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. **Nat Cell Biol.**, 3: 922-926, 2001.

ZHAO, X; ALVARADO, D; RAINIER, S; LEMONS, R; HEDERA, P; WEBER, C.H; TUKEL, T; APAK, M; HEIMAN-PATTERSON, T; MING, L; BUI, M; FINK, J.K. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. **Nat Genet.**, 29(3): 326-331, 2001.

ZHENG, J; CAHILL, S.M; LEMMON, M.A; FUSHMAN, D; SCHLESSINGER, J; COWBURN, D. Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. **J Mol Biol.**, 255(1): 14-21, 1996.

ZÜCHNER, S; MERSIYANOVA, I.V; MUGLIA, M; BISSAR-TADMOURI, N; ROCHELLE, J; DADALI, E.L; ZAPPIA, M; NELIS, E; PATITUCCI, A; SENDEREK, J; PARMAN, Y; EVGRAFOV, O; JONGHE, P.D; TAKAHASHI, Y; TSUJI, S; PERICAK-VANCE, M.A; QUATTRONE, A; BATTALOGU, E; POLYAKOV, A.V; TIMMERMAN, V; SCHRÖDER, J.M; VANCE, J.M. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. **Nat Genet.**, 36(5): 449-451, 2004.